

**CHARAKTERISIERUNG DER CHEMISCH INDUZIERTEN
DIFFERENZIERUNG DER EMBRYOKARZINOMZELLINIE
PCC7-S AZAR1 KLON 1009
MIT HILFE MONOKLONALER ANTIKÖRPER**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt
von
Gerhild Müller
aus Soest
Dortmund 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

**CHARAKTERISIERUNG DER CHEMISCH INDUZIERTEN
DIFFERENZIERUNG DER EMBRYOKARZINOMZELLINIE
PCC7-S AZAR1 KLON 1009
MIT HILFE MONOKLONALER ANTIKÖRPER**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt
von
Gerhild Müller
aus Soest
Dortmund 1988

CHARAKTERISIERUNG DER CHEMISCH INHUIERTEN
DIFFERENZIERUNG DER ERNUTZUNGSWERTHEIT
HOCH-LEBENS MIT
MIT HILFE MONODIMENSIONALER ANTIKÖRPER

Charakterisierung
der Beziehung des Erbes
einer Reihe von Antikörpern
von Antikörpern der Erbsche
in der Antikörper-Produktion

Referent:	Prof. Dr. R. Berzborn
Korreferent:	Prof. Dr. B. Hess
3. Prüfer:	Prof. Dr. K.P. Hoffmann
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. H.Ch. Lüttgau

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.1988

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 1985 bis Mai 1988 am Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie in Dortmund angefertigt.

Herrn Prof. Dr. A. Maelicke danke ich für die Stellung des Themas sowie seine ständige sachkundige Betreuung und wertvolle Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. B. Hess danke ich für seine Unterstützung, ihm und Herrn Prof. Dr. R. Berzborn außerdem für ihre Bereitschaft, als Gutachter für diese Arbeit tätig zu sein.

Herrn Dr. K. Lang danke ich für die Einführung in die Technik der Gewinnung von Gehirnprimärkulturen.

Frau S. Rheinhardt-Maelicke danke ich für Einweisung und Unterstützung bei der Herstellung von Gehirnschnitten.

Frau Dr. E. Lang danke ich herzlich für die ständige Hilfsbereitschaft und wertvolle Diskussionen.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Maelicke, insbesondere Frau Dr. M.-L. Mazauric-Stüker und Frau H. Rimpel, danken, die meine Arbeit hilfreich unterstützt haben. Frau C. Riemer danke ich für die große Hilfe bei der Schriftlegung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	Seite iv
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Material und Methoden	10
1. Versuchstiere	10
2. Kultivierung von Zellen	10
2.1 Lösungen	10
2.2 Kultivierung der Zelllinie PCC7-S Azar1 Klon 1009	11
2.3 Kultivierung weiterer Zelllinien und Primärkulturen	12
3. Mycoplasmentest	14
4. Desintegration von Kleinhirnzellen	15
5. Herstellung von Gefrierschnitten von Maus- hirnen	15
6. Herstellung monoklonaler Antikörper	16
6.1 Myelomzelllinien	16
6.2 Immunisierungen und Fusionen	17
6.3 Aufzucht, Selektion und Klonierung der Hybridoma	19
6.4 Bestimmung der Immunglobulinklasse	20
7. Immunologische Tests	20
7.1 Immunfluoreszenz	20
7.2 Komplement-abhängige Zellyse	26
8. Reinigung der monoklonalen Antikörper EX-1, EX-3 und EX-4 über Ultrogel AcA22	27
9. Biotinmarkierung monoklonaler Antikörper	31
10. Herstellung von 1009-Zellmembranpräparationen	31
11. Enzymatische Verdauung adhärenter Zellen	32
12. Allgemeine biochemische Arbeitsmethoden	32
12.1 Radiomarkierung von zellulären Proteinen	32
12.2 Solubilisation der radiomarkierten Zellen	34
12.3 Immunpräzipitation	34
12.4 Eindimensionale Gelelektrophorese	35
12.5 Immunoblottingtechnik	37
12.6 Proteinbestimmung	38

	Seite
III. Ergebnisse	39
1. Induzierte Differenzierung der EC-Zelllinie PCC7-S AzaR1 Klon 1009	39
1.1 Verwendete Zellmarker	39
1.2 Das induzierte Differenzierungsmuster	41
2. Die Produktion monoklonaler Antikörper	42
2.1 Strategien zur Selektion und Charakterisierung der Antikörper	43
2.2 Immunisierungen und erzeugte Antikörper	44
3. Zelluläre Lokalisation der durch die monoklonalen Antikörper EX-1 bis EX-6 charakterisierten Antigene	46
3.1 Eigenschaften des durch den monoklonalen Antikörper EX-1 markierten Antigens	47
3.1.1 Expression im Verlauf der induzierten Differenzierung von 1009-Stammzellen	47
3.1.2 Untersuchungen zur Gewebespezifität des markierten Antigens	51
3.1.3 Charakterisierung des Antigen-exprimierenden Zelltyps mit Hilfe etablierter Marker-moleküle	52
3.1.3.1 Doppelimmunfluoreszenzstudien im 1009-Zellmodell	53
3.1.3.2 Doppelimmunfluoreszenzstudien an Primärkulturen des Kleinhirns der Maus	58
3.1.4 Zusammenfassung der in Kapitel 3.1 dargestellten Ergebnisse	60
3.2 Eigenschaften der durch die monoklonalen Antikörper EX-2, EX-3, EX-4, EX-5 und EX-6 markierten Antigene	61
3.2.1 Expression im Verlauf der induzierten Differenzierung von 1009-Stammzellen	61
3.2.1.1 Untersuchungen zu Antikörper EX-2	61
3.2.1.2 Untersuchungen zu Antikörper EX-3	63
3.2.1.3 Untersuchungen zu Antikörper EX-4	64
3.2.1.4 Untersuchungen zu Antikörper EX-5	65
3.2.1.5 Untersuchungen zu Antikörper EX-6	66

	Seite
3.2.1.6 Allgemeine Anmerkungen	66
3.2.2 Untersuchungen zur Gewebespezifität der durch die Antikörper EX-2 bis EX-6 markierten Antigene	69
3.2.3 Charakterisierung des die Antigene EX-3 und EX-4 bindenden Zelltyps mit Hilfe etablierter Zellmarker	72
3.2.4 Zusammenfassung der in Kap. 3.2 dargestellten Ergebnisse	75
4. Immunhistologische Untersuchungen zur Antigenexpression der Antikörper EX-1 bis EX-6	76
4.1 In situ Expression des EX-1-Antigens	76
4.2 In situ Expression des EX-4-Antigens	78
4.3 In situ Expression des EX-6-Antigens	79
4.4 Zusammenfassung der Immunfluoreszenz-ergebnisse aller selektionierten Antikörper	82
5. Untersuchungen zur molekularen Struktur der Antigene EX-1, EX-3 und EX-4	84
5.1 Allgemeine Tests mit Hilfe von Enzymen an adhärenen Zellen	84
5.2 Immunpräzipitationen mit den Antikörpern EX-1, EX-3 und EX-4	86
5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kap. 5	88
6. Anwendung des Antikörpers EX-1 in entwicklungsbiologischen Fragestellungen	90
6.1 Neurale Vorläuferstudien mittels Komplement-abhängiger Zellyse	90
6.2 EX-1-exprimierende Vorläuferzellen nach Induktion mit RA	93
6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kap. 6	97
IV. Diskussion	99
V. Zusammenfassung	111
VI. Literaturverzeichnis	113

Abkürzungen:

BME	<u>B</u> asal <u>M</u> edium <u>E</u> agle
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie (= $2,22 \times 10^{12}$ dpm)
CMF-HBSS	<u>C</u> alcium- <u>M</u> agnesium- <u>F</u> ree <u>H</u> ank's <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution
dbcAMP	Cyclisches Dibuturyl-adenosin-3',5'-monophosphat
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
EC	Embryokarzinom
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immuntest
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	fötales Kälberserum
FITC	<u>F</u> luorescein- <u>i</u> so- <u>T</u> hiocyanat
GFAP	<u>G</u> lial <u>F</u> ibrillary <u>A</u> cidic <u>P</u> rotein
HAT	<u>H</u> ypoxanthin- <u>A</u> minopterin- <u>T</u> hymidin
HS	Pferdeserum
Ig	<u>I</u> mmunglobuline
i.p.	<u>i</u> ntraperitoneal
i.v.	<u>i</u> ntravenös
NF	<u>N</u> eurofilamente
NP-40	<u>N</u> onidet <u>P</u> -40
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PEG	<u>P</u> olyethylenglykol
PMSF	<u>P</u> henyl- <u>m</u> ethyl- <u>s</u> ulfonyl- <u>f</u> luorid
POD	Peroxidase
RA	All-trans Retinolsäure
RIA	Radioimmuntest
SDS	Natriumdodecylsulfat
TC	Teratokarzinom
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TEMED	<u>N,N,N',N'</u> -Tetramethyl-Ethylendiamin
TR	<u>T</u> exasrot
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Das Nervensystem der Vertebraten stellt ein in seiner Komplexität in Struktur und Funktion einzigartiges Gewebe dar (1). Allein das Gehirn als ein Bestandteil des ZNS besteht bei dem Mensch aus ca. 100 Milliarden Nervenzellen (2). Seine Entwicklung aus einfachen Strukturen läuft nach ähnlichen Prinzipien wie bei anderen Organen ab, wobei wichtige zelluläre Mechanismen die Zelldetermination und Zelldifferenzierung darstellen (3). Bei einer determinierten Zelle ist die künftige Entwicklungsrichtung durch Änderung innerer Eigenschaften der Zelle festgelegt. Die Potenz der determinierten Zelle ist somit im Vergleich zur nicht determinierten Zelle verringert. Nach Differenzierung ist hingegen biochemisch eine Änderung nachzuweisen. Determination und Differenzierung sind ausschließlich Ursache einer veränderten Regulation der Genexpression, während der Genotyp der Zelle unverändert bleibt (4).

Zur Bildung des Nervensystems führt in der Embryonalentwicklung eine Interaktion der äußeren Zellschicht der Gastrula, des Ektoderms, mit dem darunterliegenden mesodermalen Gewebe, welches als Induktor bezeichnet wird (5,6). Das Signal des Mesoderms ist örtlich und zeitlich nicht einheitlich. Ein cephalocaudaler Gradient bestimmt die regionale Gliederung des Nervensystems, wobei zuerst die Vorderhirnstrukturen, dann die Mittel- und Hinterhirnstrukturen und das Rückenmark induziert werden. Nach dieser neuralen Determination des Ektoderms erfolgt während der Neurulation die Bildung der Neuralplatte, durch Einfaltung die Bildung der Neuralgrube bis sich schließlich dorsal das Neuralrohr abschnürt, aus dem sich das zentrale Nervensystem mit Gehirn und Rückenmark entwickelt. Während dieser Prozesse trennen sich dorsal vom Neuralrohr Zellen ab, die die Neuralleiste bilden. Aus dieser wandern Zellen zu beiden Seiten des Neuralrohrs in den Organismus und bilden das periphere Nervensystem und weitere Zelltypen (7,8). Im Folgenden sollen wichtige Stadien der Entwicklung des ZNS am Beispiel der Maus als experimentelles Versuchstier vorgestellt werden.

Erst nach Beendigung der Neurulation setzt eine deutliche Zellproliferation ein, die als charakteristisch für das ZNS in definierten Schichten, auch als Keimschichten bezeichnet, und hier zu definierten Zeiten stattfindet und zur Bildung der verschiedenen neuralen Zelltypen, Neuronen und Makrogliazellen mit Ependymzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten, führt (9). Postmitotische Zellen wandern aus den Keimschichten, bilden neue Zellschichten und differenzieren. Es besteht somit eine enge Beziehung zwischen Beendigung der Zellproliferation und Differenzierung.

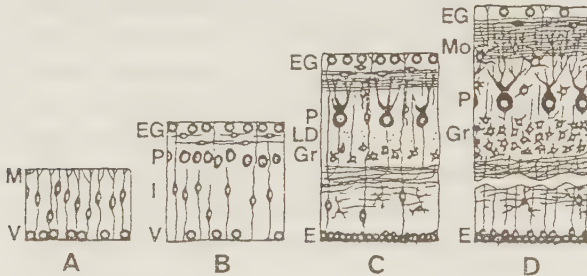


Abb.1: Stadien der embryonalen bis postnatalen (A-D) Kleinhirnentwicklung bei Säugern mit den charakteristischen Zellschichten.
Entnommen aus (10).

Abkürzungen: V = Ventrikularschicht, M = Marginalschicht, I = Intermediärschicht.

P = Purkinjezellschicht, EG = externe Körnerschicht, Gr = Körnerschicht, Mo = Molekularschicht, LD = Lamina dissecans, * markiert die Orte der Mitosen.

Besonders gut untersucht sind Vorgänge, die zur Bildung der adulten Cortexschichten führen, bei der Entwicklung des Kleinhirns (10,11). Die ersten Kleinhirnzellen werden bei der Maus am embryonalen Tag 10-11 gebildet und gehen aus Zellen des 4. Ventrikeldachs hervor. Hier umgibt, wie auch in anderen Regionen des ZNS, zunächst die Ventrikularschicht (V) oder Neuroepithelschicht als Keimschicht einen zentralen Hohlraum (Abb.1: A). Die Ventrikular- oder Neuroepithelzellen sind mit Fortsätzen sowohl an der Innenseite zum Ventrikel als auch an der äußeren Oberfläche befestigt. Die Zellfortsätze bilden an der Außenseite eine weitere Zellschicht, die Marginalschicht (M). Mitosen finden in der Ventrikularschicht nur in einer Zelle (*), direkt am Ventrikel statt. Während der Interphase wandern die Zellkerne wieder in äußere Zelllagen. Nach Beendigung der Proliferation

wandern junge Neurone und Gliazellen nach außen und bilden dort als weitere Zellschicht die Intermediärschicht (I) (Abb.1: B). Der Ventrikularschicht im Kleinhirn entstammen die großen Neurone, Golgi-Typ-II-Zellen und Purkinjezellen, die bei der Maus am embryonalen Tag 12-15 bzw. 11-13 gebildet werden. In der äußeren Zone der Intermediärschicht differenzieren die Purkinjezellen und bilden die Purkinjezellschicht (P), eine Schicht des adulten Kleinhirncortex. Die Proliferation der Ventrikularschicht endet am embryonalen Tag 17. Hiernach kleiden die Ependymzellen (E) den Ventrikel aus (Abb.1: C,D). Charakteristisch für das Kleinhirn ist die Bildung einer 2. Keimschicht, der externen Körnerschicht (EG) an der Oberfläche des Kleinhirns (Abb.1: B-D). Die Zellen entstammen aus dem rostralen Teil der Rhombischen Lippe. Die mitotische Aktivität der externen Körnerschicht beginnt am embryonalen Tag 13-15. Postmitotische Zellen, aus denen Gliazellen und kleine Neurone differenzieren, wandern nach Beendigung der Mitose nach innen. Als Folge der Migration entsteht eine weitere Zellschicht, die Molekularschicht (Mo) (Abb.1: D). Die Korb- und Sternneurone nehmen in der Molekularschicht ihre endgültige Position ein, die Körnerzellen, als dritter kleiner Neuronentyp, wandern noch durch die Purkinjezellschicht und bilden die Körnerschicht (Gr) (Abb.1: C,D). Die 3 Schichten Molekularschicht, Purkinjezellschicht und Körnerschicht bilden die Kleinhirnrinde im adulten Tier. Die mitotische Aktivität der externen Körnerschicht hält auch postnatal noch ca. 2 Wochen an. Mit der Lamina dissecans wird in der Entwicklung des Kleinhirns vorübergehend eine zellfreie Schicht zwischen Purkinjezellschicht und Körnerschicht gebildet (Abb.1: C). Hier ist zu erwähnen, daß bei der Entwicklung des Vorderhirns ausschließlich eine Migration postmitotischer Zellen aus der Ventrikularschicht und Subventrikularschicht nach außen erfolgt (10). Die Subventrikularschicht, die 2. Keimschicht, wird außerhalb der Ventrikularschicht durch auswandernde mitotische Zellen angelegt. Auch deren mitotische Aktivität hält vergleichbar zur externen Körnerschicht des Kleinhirns noch postnatal an.

Schlüsselfragen der neuralen Entwicklungsbiologie sind nun, welche molekularen Mechanismen zur Determination und Differenzierung führen und in welchen Bahnen die neuralen Zelltypen, Neurone und die Makrogliazelltypen aus den homogen erscheinenden Neuroepithelzellen oder anderen Keimzellen gebildet werden. Liegen gemeinsame Vorläuferzellen für verschiedene neurale Zelltypen und somit ein gemeinsamer Stammbaum vor oder entwickeln sich die verschiedenen Zelltypen in getrennten Bahnen?

Experimentelle Probleme bei der Untersuchung dieser Fragen ergeben sich zum einen durch die geringe Menge an Zellen und deren Unzugänglichkeit in frühen Entwicklungsstadien und zum anderen durch die zunehmende Komplexität des Gewebes in späteren Entwicklungsstadien. Während differenzierte Zelltypen auf Grund morphologischer Merkmale und der Expression spezifischer Moleküle, sog. Markermoleküle, charakterisiert werden können (12-14), sind zudem erst wenige Marker für Vorläuferzellen beschrieben. Bislang wurden 2 verschiedene Ansätze zur Stammbaumanalyse im ZNS angewendet. Eine Arbeitsgruppe bediente sich der in vitro Kultivierung sich entwickelnder Gehirnstrukturen, sog. Primärkulturen. So konnten Raff et al. in Kulturen vom postnatalen optischen Nerv und embryonalen Gehirn der Ratte gemeinsame Vorläuferzellen für Oligodendrozyten und den TypII-Astrozyten (15) zeigen (16-18). Als Nachweisreagenz diente ihnen der monoklonale Antikörper anti-A2B5, der ein Membranmolekül charakterisiert, welches von verschiedenen reifen neuralen Zelltypen in Kulturen des ZNS von Vertebraten (15,19,20), aber auch von gemeinsamen Vorläuferzellen der oben genannten Makrogliazellen exprimiert wird (16-18). Eine andere Arbeitsgruppe bediente sich der retroviralen in situ Markierung von Vorläuferzellen (21,22). Die stabil integrierten Vektoren werden nach Teilung an die Tochterzellen vererbt und ermöglichen bei Verwendung spezifischer Markergene, deren Produkte exprimiert werden, eine histochemische Charakterisierung eines Zellstammbaums. Cepko et al. konnten so in der sich entwickelnden Retina der Ratte erstmals gemeinsame Vorläuferzellen für Neurone und Gliazellen aufzeigen (23).

Nachteile beider Systeme sind jedoch, daß zum einen heterogenes Zellmaterial vorliegt und zum anderen kein Einfluß auf die Induktion der Differenzierung genommen werden kann. Ferner sind in situ Markierungen zur Stammbaumanalyse nur in jenen Geweben möglich, in denen hinreichend geringe Migrationen eine direkte Zuordnung der Zellen zu einem Stammbaum ermöglichen. Unsere Arbeitsgruppe wählte daher zur Untersuchung der genannten Fragestellungen ein einfaches, leicht zugängliches in vitro Zellmodell, Embryokarzinomzellen der Maus (=EC-Zellen), bei denen die Differenzierung durch definierte Substanzen induziert werden kann.

EC-Zellen sind die malignen Stammzellen von Teratokarzinomen (24-27), die spontan aus primären Keimzellen entstehen können (28-30), oder deren Bildung durch Transplantation früher Embryonen in extrauterines Gewebe induziert werden kann (31,32). EC-Zellen können nicht nur durch Proliferation zur eigenen Vermehrung führen, sondern auch differenzieren, so daß Teratokarzinome aus verschiedenen differenzierten Geweben bestehen (Abb.2).

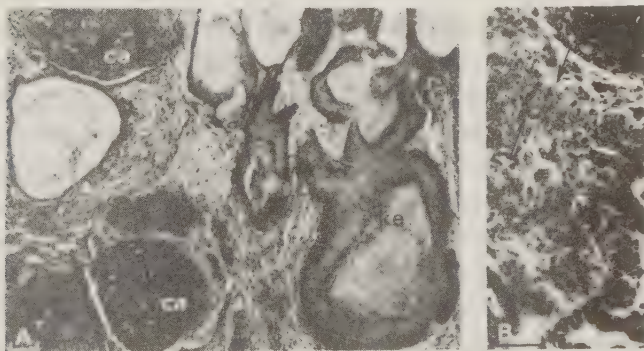


Abb.2: Gewebeschnitt durch ein Mausteratokarzinom mit verschiedenen differenzierten Zelltypen in A und EC-Zellen (markiert durch Pfeile) in B.
Abkürzungen: ca=Knorpelgewebe, ke=keratinisierendes, epitheliales Gewebe (Haut)
Entnommen aus (27). Der Balken entspricht 100µm.

Eine Vielzahl von EC-Zellen sind in Kultur genommen und hieraus Zelllinien etabliert worden, die nach Injektion in syngene Mäuse wieder Teratokarzinome bilden können (33-36). Auf Grund ihrer undifferenzierten Zellmorphologie und des Differenzierungspotentials wurden Gemeinsamkeiten von EC-Zellen mit frühen embryonalen Zellen diskutiert. Dies wurde belegt anhand der Expression spezifischer Markermoleküle, sog. Stammzellmarker, die nur von den genannten Zellen, aber in der Regel nicht von differenzierten Zellen im adulten Organismus bzw. differenzierten Teratokarzinomzellen exprimiert werden und mittels spezifischer Antikörper charakterisiert werden können (37-43). Eine EC-Zelllinie ist jedoch als in vitro Zellmodell für Entwicklungsvorgänge nur dann geeignet, wenn von einer homogenen EC-Zellpopulation ausgegangen werden kann. Häufig zu beobachten ist jedoch, daß auch in vitro eine spontane Differenzierung stattfindet, wobei auslösende Faktoren hohe Zelldichte, Aggregation der Zellen und Änderungen der Medienzusammensetzung sein können (44-47). Es ist daher unbedingt erforderlich, EC-Zellen in exponentieller Wachstumsphase und konstanter Medienzusammensetzung zu kultivieren. Eine induzierte Differenzierung ist bei einigen Zelllinien nach Zugabe der chemischen Induktoren Retinolsäure (RA), RA und cyclisches Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat (dbcAMP), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Hexamethylenbisacetamid (HMBA) beobachtet worden (48-54). Eine ideale Zelllinie zum Studium der neuralen Differenzierung müßte entsprechend den Neuroepithelzellen neural determiniert sein und unter möglichst definierten Induktionsbedingungen in neurale Derivate differenzieren. In der Literatur sind drei EC-Zelllinien, C17-S1 Klon 1003 (47), P19 (55) und PCC7-S und dessen Azaguanin-resistenter Klon PCC7-S AzaR1 Klon 1009 (56) mit vorwiegend neuraler Differenzierung beschrieben. 1003-Zellen differenzieren dabei in serumfreiem Medium (47) und P19-Zellen nach Induktion mit RA und vorausgegangener Aggregation (55). Von unserer Arbeitsgruppe wurde die EC-Zelllinie PCC7-S AzaR1 Klon 1009 als in vitro Zellmodell herangezogen, da neben der neuralen Differenzierung wie weiter unten gezeigt wird die 2 Voraussetzungen, ein definiertes Induktionssignal, erfüllt ist.

Die PCC7-S-Zellen entstammen einem spontan entstandenen, testikulären Tumor des rekombinanten Inzuchtmäusestamms 129xC57Bl/6J und differenzieren in vivo in eine Vielzahl von Zelltypen (56). Pfeiffer et al. beschrieben als erste eine in vitro Differenzierung nach Aggregation der Zellen und nachfolgender Adhäsion in vorwiegend cholinerge Neurone (57). Morphologisch beobachteten sie die Ausbildung von Neuronen und biochemisch die Zunahme der Enzymaktivitäten von Cholinacetyltransferase und Acetylcholinesterase, beides Enzyme, die an der Neurotransmission beteiligt sind. Nach Stimulierung mit dem Neurotoxin Veratridin zeigten die Kulturen einen erhöhten Natrium-Einstrom. Paulin et al. beobachteten eine neurale Differenzierung der 1009-Zellen nach chemischer Induktion (58) anhand der Expression spezifischer Intermediärfilamentproteine (59,60). Nach Zugabe von RA wurden Neurofilamentproteine als charakteristische Intermediärfilamente (61-63) für Neurone, und nach Zugabe von RA und dbcAMP zusätzlich GFAP (64,65) als charakteristisches Intermediärfilament für Astrozyten exprimiert. Eddie et al. zeigten weiterhin in mit RA und dbcAMP induzierten 1009-Kulturen die Expression neuraler Moleküle wie β' Tubulin und des Gehirnisoenzyms Kreatinphosphokinase (66). RA bzw. RA und dbcAMP stellen somit bei 1009-EC-Zellen definierte Induktionssignale dar, wobei insbesondere der Effekt von RA für Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Differenzierung interessant erscheint. Für RA sind neben der Differenzierung von EC-Zellen (48,49,52,67) eine Vielzahl von anderen Effekten auf Zellen beschrieben worden (68). RA ist kürzlich als erstes Morphogen bei Vertebraten identifiziert worden (69). Eichele und Thaller konnten einen Konzentrationsgradienten von RA in der Zone polarisierender Aktivität, ein Bereich der als Auslöser für die Gliedmaßenentwicklung beim Huhn gilt, messen. Weiterhin sind die Gene für ein zelluläres Bindungsprotein sowie für einen Kernrezeptor für RA kloniert worden (70,71,166).

1009-Zellen sind nur dann ein geeignetes Zellsystem zur Analyse der neuralen Differenzierung, wenn sowohl der zeitliche Verlauf als auch das Differenzierungsmuster der Zelltypen

nach chemischer Induktion stabil und reproduzierbar ist. Hierzu mußten möglichst alle nach Induktion zu beobachtenden Zelltypen charakterisiert werden. Zwar haben schon Pfeiffer et al. nach Aggregation der 1009-Zellen Zellen mit flacher Morphologie beobachtet, die die genannten neuralen Eigenschaften nicht zeigten, deren Zelltyp aber nicht weiter charakterisiert wurde (57). In unserer Arbeitsgruppe wurde daher ein Repertoire an kommerziell erhältlichen und zur Verfügung gestellten Antikörpern zusammengestellt, die neben einem immunologischen Nachweis neuraler Zelltypen wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen, den Nachweis epithelialer, endothelialer, mesenchymaler Zellen und Muskelzellen ermöglichten. Die Bindung der Antikörper wurde nach Induktion mit den chemischen Substanzen RA und dbcAMP in der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Die Antikörper und das mit Hilfe von Frau Dr. M.-L. Mazauric-Stüker und Frau Dr. E. Lang charakterisierte stabile und reproduzierbare Differenzierungsmuster sind im ersten Kapitel des Ergebnisteils zusammengestellt.

Bei den genannten Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigte sich, daß die Spezifität einiger der verwendeten Antikörper zur eindeutigen Charakterisierung bestimmter Zelltypen nicht genügte. Die Charakterisierung anderer Zelltypen erfolgte zudem anhand spezifischer Intermediärfilamente, d.h. intrazellulärer Marker, so daß eine Möglichkeit zur Selektion vitaler Zellen nicht gegeben war. Ferner war abzusehen, daß zur Selektion und Charakterisierung neuronaler Zellen Antikörper mit neuronaler Spezifität in größeren Mengen Anwendung finden würden. Geeignete Antikörper mit neuronaler Spezifität gegen ein membranständiges Molekül standen jedoch nicht zur Verfügung. Für Stammbaumanalysen fehlten ferner Antikörper zur Charakterisierung von Vorläuferzellen. Der von Raff et al. verwendete Antikörper anti-A2B5 (16-18) eignete sich nicht, da das korrespondierende Antigen im 1009-Zellmodell erst zu einem recht späten Zeitpunkt exprimiert wird.

Meine Aufgabe im Rahmen der Dissertation bestand nun darin, ein Repertoire an eigenen monoklonalen Antikörpern herzustellen. Diese sollten in der Charakterisierung des chemisch induzierten 1009-Zelldifferenzierungsmodells, d.h. der Aufschlüsselung des zeitlichen Differenzierungsmusters und der differenzierten Zelltypen, Anwendung finden. Eine Charakterisierung sollte somit weitgehend die Verwendung etablierter Zellmarker umgehen, Schwächen in der Charakterisierung mit den etablierten Zellmarkern aufzeigen und ein Vergleich der Ergebnisse aus beiden Charakterisierungen eine möglichst detaillierte Charakterisierung ermöglichen. Daneben sollten die neuen Antikörper für weiterführende Studien zu entwicklungsbiologischen Fragestellungen, neuraler Stammbaumanalyse und Mechanismen der Induktion und Differenzierung, herangezogen werden. Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, mußte durch die Wahl eines geeigneten Testsystems Antikörper mit spezifischen Eigenschaften, stadien- bzw. zelltypspezifische Expression der korrespondierenden Antigene im 1009-Zellmodell, selektioniert werden.

Gefunden und charakterisiert wurden sechs monoklonale Antikörper, EX-1 bis EX-6, die aus Immunisierungen von Ratten mit Zellmaterial differenzierter 1009-Zellen hervorgegangen sind. Den Schwerpunkt der Arbeit bildete neben der Herstellung dieser Antikörper die Charakterisierung der Expression der korrespondierenden Antigene im 1009-Zellmodell, sowie deren gewebespezifische Expression. Als Testsystem wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewendet. Hervorzuheben ist der Antikörper EX-1, der sich neben seiner vorwiegend neuronalen Zellspezifität insbesondere durch seine Bedeutung für neurale Stammbaumanalysen auszeichnet. Wenngleich die molekulare Struktur seines Antigens bisher noch nicht bestimmt werden konnte, stellt dieser Antikörper einen der seltenen Zellmarker dar, die neben reifen Zelltypen auch Vorläuferzellen markieren.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Versuchstiere

Balb/c-Mäuse und C57Bl/6J-Mäuse wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierkunde in Hannover bezogen. LOU-Ratten wurden freundlicherweise von Prof. M. Rajewsky vom Institut für Zellbiologie in Essen zur Verfügung gestellt. Die weitere Zucht und Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall des Max-Planck-Instituts für Ernährungsphysiologie in Dortmund.

2. Kultivierung von Zellen

Um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden, mußten alle Gegenstände und Lösungen sterilisiert vorliegen. Als sterile Arbeitsplätze dienten Laminar-Fallstrom- und Gegenstrom-Arbeitsplätze. Die Inkubationen der Kulturen erfolgten in CO₂-Begasungsbrutschränken von HERAEUS, Hanau bei 37°C und feuchter Atmosphäre. Zentrifugationen der Zellen wurden 10 min bei 120 g mit einer Laborfuge GL von HERAEUS, Hanau und routinemäßige mikroskopische Beobachtungen der Zellen mit einem ZEISS-Invertmikroskop durchgeführt.

2.1 Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline): 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 6,5mM Na₂PO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,4

Grundmedien: DMEM (FLOW LABORATORIES, Meckenheim, in Pulverform bezogen und unter Zusatz von 3,6g/l NaHCO₃ entsprechend den Herstellerangaben als flüssiges Medium angesetzt)
BME mit Hank's Salzen, ohne Glutamin (GIBCO, Glasgow)

Seren: fötales Kälberserum (FCS) und Pferdeserum (HS) (BOEHRINGER, Mannheim), hitzeinaktiviert bei 56°C.

2.2 Kultivierung der Zelllinie PCC7-S AzaR1 Klon 1009 (=1009)

2.2.1 Kultivierung der EC-Zellen

Die 1009-EC-Zellen (56) wurden in liegenden 250ml-Plastik-kulturflaschen (GREINER, Nürtingen) bei 11% CO₂ in jeweils 20ml DMEM mit 15% FCS kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wurden die adhärennten Zellen durch Abspülen mit einer Pasteurpipette abgelöst, in frisches Medium überführt und in einer Zelldichte von 5×10^3 oder 10^4 Zellen pro cm² in frischen Flaschen neu ausgesät, wobei die Zelldichte zuvor mittels einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt wurde. Der Anteil toter Zellen wurde im Trypanblautest durch Versetzen eines Aliquots der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer 0,09%igen Trypanblaulösung in PBS mit 0,01% NaN₃ bestimmt. Alle 2 bis 3 Monate wurden Zellen der Passagenzahl 10, bezogen auf die Anzahl der Subkultivierungen nach Erhalt der Zelllinie von Frau Dr. H. Jakob (Institut Pasteur, Paris), aufgetaut, so daß in der Regel nie mit einer Passagenzahl über 40 gearbeitet wurde.

Zur Durchführung von Immunfluoreszenzuntersuchungen an adhärennten Zellen wurden die EC-Zellen auf 12mm Glasdeckgläsern (ASSISTENT, K. Hecht, Sondheim) in 24-Lochplatten (COSTAR, Cambridge, USA) in Zellkonzentrationen von 1×10^4 bis 2×10^4 pro cm² in 1ml Medium ausgesät. Stammzellen wurden in der Regel 2 Tage nach Ansatz für die Versuche verwendet.

2.2.2 Differenzierung der EC-Zellen

1009-EC-Zellen wurden durch Zugabe der chemischen Induktoren RA (All-trans-Retinsäure, SIGMA, München) und dbcAMP (cyclisches Dibutyryl-adenosin-3',5'-monophosphat, BOEHRINGER, Mannheim) differenziert (modifiziert nach 58). Die Zellen wurden in Kulturflaschen oder auf 12mm Glasdeckgläsern (ASSISTENT, K. Hecht, Sondheim) in 24-Lochplatten (COSTAR) in Zellkonzentrationen von $1,5 \times 10^4$ oder 2×10^4 pro cm² in DMEM mit 15% FCS ausgesät. Nach einem Tag wurde dem Medium

RA in einer Endkonzentration von 10^{-7}M zugesetzt. Hierzu wurde eine RA-Stammlösung (1mg/ml DMSO, -80°C) nacheinander 1:20 in DMSO, 1:10 in dest. Wasser und schließlich bis zur Endkonzentration (10^{-7}M) in Kulturmedium verdünnt. Nach einem weiteren Tag wurde das Medium entfernt und frisches Medium mit RA in einer Konzentration von 10^{-7}M und zusätzlich dbcAMP in einer Konzentration von 1mM (aus einer 0,1M Stammlösung, -20°C) zugesetzt. Der Zeitpunkt der dbcAMP-Zugabe wurde als Differenzierungstag 0 (=D0) und alle weiteren Tage entsprechend als D1, D2 usw. bezeichnet.

2.3 Kultivierung weiterer Zelllinien und Primärkulturen

Andere in Tabelle I aufgeführte und zur Charakterisierung der gewebespezifischen Bindung der produzierten monoklonalen Antikörper eingesetzte Zelllinien wurden in DMEM mit 5-15% FCS wie die 1009-EC-Zellen kultiviert und passagiert. Bei den Hybridzelllinien wurde dem Medium noch 3,5mg/ml Glukose und die Selektionskomponenten Hypoxanthin, Thymidin und Aminopterin (siehe Kap. 6.2.1) zugesetzt. Die Zelllinie GH₃ wurde zudem in DMEM mit 15% HS und 2,5% FCS kultiviert. Mußten stark adhärente Zelllinien mit EDTA oder Trypsin abgelöst werden, so wurde zunächst 1 x mit PBS gewaschen und dann eine 1mM Lösung des Dinatriumsalzes der EDTA-Säure in PBS pH 7,4 oder eine 0,025%ige Trypsinlösung in PBS bodenbedeckend zupipettiert. Durch Schütteln der Flaschen in regelmäßigen Abständen wurde das Ablösen überprüft. Bei Verwendung von Trypsin wurden die Zellen anschließend zur Proteaseinhibierung in FCS-haltiges Medium oder PBS überführt. Zur Durchführung der Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden die Zellen auf Glasdeckgläsern kultiviert, die bei den PC12-Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet waren (siehe Kultivierung von Kleinhirnzellen).

Tab. I: Zur Charakterisierung der Gewebespezifität der monoklonalen Antikörper verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp (Spezies)*	erhalten von
NCB20	Hybridzellen von N18 Neuroblastomzellen (Maus) mit Embryozellen (Chinesischer Hamster) (72)	Dr. Traber, Tropon Werke, Köln
108CC15	Klon der Neuroblastom-Gliomhybridzellen N18 (Maus) x C6 (Ratte) (73,74)	Dr. Traber, Tropon Werke, Köln
108CC5	Klon der Neuroblastom-Gliomhybridzellen N18 (Maus) x C6 (Ratte) (73,74)	Dr. Traber, Tropon Werke, Köln
NIE 115	Neuroblastomklon der Linie C1300 (Maus) (75)	Dr. Traber, Tropon Werke, Köln
C6	Gliomzellen (Ratte)(76)	Prof. M. Rajewsky, Institut für Zellbiologie, Essen
PYS-2	parietale Entodermzellen (Maus) (77)	Dr. R. Kemler, Friedrich-Miescher-Institut, Tübingen
PFHR 9	parietale Entodermzellen der EC-Zelllinie PCC4-F (Maus) (78,79)	Prof. V. Schirmmacher, Deutsches Krebs- forschungszentrum, Heidelberg
3T3	Fibroblasten (Maus) (80)	Prof. M. Rajewsky, Institut für Zellbiologie, Essen
L 929	Fibroblasten (Maus) (81)	Prof. E. Rüde, Institut für Immunologie, Mainz
GH ₃	Hypophysenzellen des Tumors MZT/W5 (Ratte) (82)	American Type Culture, Collection, Rockville
MH ₁ C ₁	Hepatomzellen (Ratte)(83)	Prof. K. Willecke, Institut für Zellbiologie, Essen
HELP I30	Keratinocyten (Maus) (84)	Dr. D. Breitkreutz, Deutsches Krebs- forschungszentrum, Heidelberg
PC12	Pheochromocytomzellen (Ratte) (85)	Dr. C. Richter-Landsberg, Fachbereich Biologie der Universität Bremen

* In Klammern sind zusätzlich entsprechende Literaturangaben aufgeführt.

Die Kultivierung der Kleinhirnzellen erfolgte in 6cm Gewebekulturschalen (BECTON DICKINSON, Heidelberg), in denen für Immunfluoreszenzuntersuchungen zuvor Glasdeckgläser mit einer Siliconpaste (Bayer-Silicon, ROTH, Karlsruhe) befestigt wurden. Schalen und Glasdeckgläser wurden vor Zugabe der Zellen mit einer 0,01%igen Poly-L-Lysin-Lösung (SIGMA, München, MG 120000) in dest. Wasser 1 h im CO₂-Inkubator bei 37°C beschichtet. Anschließend wurde die Poly-L-Lysin-Lösung herauspipettiert und 3 x mit PBS gewaschen. Ca. 2-4 x 10⁶ Kleinhirnzellen wurden nach Desintegration pro Gewebekulturschale in 5ml BME mit 2,5mM Glukose, 2mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Steptomycinlösung (FLOW, 5000E/ml bzw. 5000µg/ml) und 10% HS (18, wobei BME mit Eagle's Salzen durch BME mit Hank's Salzen ersetzt wurde) ausgesät und bei 5% CO₂ kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Medium erneuert.

3. Mycoplasmentest

Alle in Kultur gehaltenen etablierten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmenkontaminationen untersucht. Ein Erkennen dieser Erreger ist im Phasenkontrastmikroskop nicht möglich. Es wurde daher eine DNA-Färbung der kultivierten Zellen mit dem HOECHST-Fluoreszenzfarbstoff Nr 33258 (CALBIOCHEM, Frankfurt) nach Chen (86) durchgeführt. Während in nicht kontaminierten Kulturen ausschließlich die Zellkern-DNA angefärbt wird, sind in kontaminierten Kulturen zusätzliche extranukleäre, fluoreszierende Strukturen, verursacht durch die angefärbte DNA der Mykoplasmen, zu beobachten.

Mit Ausnahme des bei den monoklonalen Antikörpern EX-1 und EX-2 zur Immunisierung eingesetzten 1009-Zellmaterials waren alle verwendeten Zelllinien Mycoplasmen-frei.

4. Desintegration von Kleinhirnzellen

Lösungen:

CMF-HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, GIBCO), zum Teil
mit 12mM MgSO_4

Trypsin/DNaselösung: 3% Trypsin (SIGMA, E.C. 3.4.21.4) und
0,15% DNase I (SIGMA, E.C. 3.1.21.1) in CMF-
HBSS, pH 7,3

1ml dieser Stammlösung wurde vor Gebrauch mit
2ml CMF-HBSS mit 12mM MgSO_4 versetzt.

DNaselösung: 0,05% DNase I in BME

Die Enzymlösungen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Postnatale Kleinhirne von maximal einer Woche alten C57Bl/6J-Mäusen wurden präpariert und in einer Kulturschale mit CMF-HBSS mit 12mM MgSO_4 gewaschen. Mit einer Pinzette wurden die Kleinhirne in eine leere Schale überführt, mit der Schere zerkleinert und in Anlehnung an Schnitzer und Schachner (87) desintegriert, wobei jedoch die Enzyme von anderen Firmen bezogen wurden. Zunächst wurde mit der Trypsin/DNaselösung 13 min bei Raumtemperatur verdaut. Nach dreimaligem Waschen mit CMF-HBSS wurden die Zellen in der 0,05%igen DNaselösung resuspendiert und mit einer feuerpolierten Pasteurpipette titriert. Nach 5 minütigem Absitzenlassen wurde die Zellsuspension abgenommen, gewaschen und die Zelldichte in Kulturmedium eingestellt.

5. Herstellung von Gefrierschnitten von Mausgehirnen

Postnatale und adulte Gehirne von C57Bl/6J- und Balb/c-Mäusen wurden präpariert, mit einem Skalpell entlang der Mittellinie halbiert und mit der Schnittfläche auf eine kupferhaltige Münze (Geldstück) gelegt, die direkt auf Trockeneis lag. Bis zum Schneiden wurden die Gehirne bei -80°C aufbewahrt. Die Anfertigung der 8-10 μm Gefrierschnitte, horizontal bei embryonalen und sagittal bei postnatalen Gehirnen, erfolgte an einem Gefriermikrotom (Typ TE, SLEE, Mainz) bei -20°C am Institut für Zellbiologie der Universität Essen, wobei die Gehirne entsprechend der Schnittrichtung in Tissue

Tec (MILES) befestigt waren. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt, die durch kurzes Eintauchen in eine 60°C warme Lösung aus 0,5% Gelatine (SIGMA) und 0,05% $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ in dest. Wasser mit anschließender Trocknung bei 60°C beschichtet waren. Bis zur Durchführung der Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

Embryonale Gehirne und einige postnatale Gehirnschnitte von Balb/c-Mäusen wurden freundlicherweise von Frau S. Reinhardt-Maelicke vom Institut für Zellbiologie in Essen zur Verfügung gestellt.

6. Herstellung monoklonaler Antikörper

6.1 Myelomzelllinien

Als Myelomzelllinien wurden die Mauszelllinie P3X63-Ag8.653 =X63 (88) und die Rattenzelllinie Y3-Ag1.2.3 =Y3 (89), von Prof. M. Rajewsky zur Verfügung gestellt, verwendet. Beide sind HAT-sensitiv, d.h. sie sind nicht in der Lage nach Blockierung des Hauptnukleinsäuresyntheseweges mit Aminopterin die Nukleinsäuren aus den zugesetzten Vorstufen Hypoxanthin und Thymidin zu synthetisieren (90). Ursache ist der Enzymdefekt der Hypoxanthin-Guanosyl-Transferase.

Während P3X63-Ag8.653 ein sogenanntes "Nicht-produzierendes"-Myelom repräsentiert, sekretiert Y3-Ag1.2.3 leichte Immunglobulinketten vom Typ κ in das Medium.

Für die Fusion wurden beide Linien mindestens eine Woche in der exponentiellen Wachstumsphase mit maximal 5×10^5 Zellen/ml herangezogen und täglich in frisches Medium, DMEM mit 10% FCS, passagiert.

6.2 Immunisierungen und Fusionen

6.2.1 In vivo Immunisierungen und Fusionen

Chemikalien und Lösungen:

PEG-Lösung A: 5g PEG 4000 (SIGMA) wurden autoklaviert und nach Abkühlen auf 60°C im flüssigen Zustand mit 1,5ml DMSO und 5,5ml DMEM ohne Zusätze vermischt.

PEG-Lösung B: 5g PEG 4000 wurden autoklaviert und im flüssigen Zustand mit 15ml DMEM versetzt.

HAT-Selektionsmedium: DMEM mit

20% FCS

1% (v/v) Na-Pyruvatlösung (FLOW LAB., 100mM)

1% (v/v) L-Glutaminlösung (FLOW LAB., 200mM)

1% (v/v) Vitaminlösung (FLOW LAB., 100 x)

1% (v/v) Kanamycinlösung (FLOW LAB., 5000µg/ml)

5 x 10⁻⁵M Mercaptoethanol (SIGMA)

13,6µg/ml Hypoxanthin (SIGMA)

4,4µg/ml Aminopterin (SIGMA)

3,8µg/ml Thymidin (SIGMA)

Die selektionierten Antikörper EX-1 und EX-2 gingen aus der Immunisierung einer LOU-Ratte mit Membranfragmenten D2-differenzierter 1009-Zellen (siehe Kap. 7.1) hervor. Das Tier wurde 3 x in Abständen von 6 bzw. 4 Wochen i.v. mit ca. 0.58 mg Protein immunisiert. 2 Tage vor der Fusion wurden peritoneale Makrophagen von Balb/c-Mäusen durch Auswaschen der Bauchhöhle gewonnen. Diese wurden in HAT-Selektionsmedium aufgenommen und a 100µl mit 10⁴ Zellen pro Loch in 96-Lochplatten (COSTAR) verteilt.

Die Milzzellen der immunisierten Ratten wurden 5 Tage nach der letzten Injektion mit dem Rattenmyelom Y3 fusioniert. Myelomzellen und Milzzellen wurden gewonnen und je zweimal mit DMEM gewaschen. 4 x 10⁷ Myelomzellen wurden mit 10⁸ Milzzellen gemischt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem trockenen Zellpellet wurde 0,5ml PEG-Lösung A pipettiert, mit einer 1ml Pipette umgerührt und zwischen den Händen haltend für 1 min geschüttelt. Hiernach wurde 0,5ml

PEG-Lösung B zugegeben und weitere 2-3 min bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Nach langsamer Zugabe von 4ml HAT-Medium wurde für 5 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend 36ml HAT-Selektionsmedium zupipettiert. 100µl Aliquots wurden pro Loch einer 96-Lochplatte zu den vorgelegten Mausemakrophagen pipettiert. Da das Medium noch PEG enthielt, wurde an den 3 darauffolgenden Tagen jeweils die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt.

6.2.2 In vitro Immunisierungen und Fusionen

Chemikalien und Lösungen:

HAT-Selektionsmedium und PEG-Lösung A siehe Kap. 6.2.1

Immunisierungsmedium: DMEM mit

20% FCS

20µg/ml Adjuvantpeptid (N-Acetylmuramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamin, CALBIOCHEM)

Die Milzzellen weibl. LOU-Ratten wurden gewonnen und $1,6 \times 10^8$ Zellen in die Antigen-enthaltenen Gewebekulturflaschen mit je 20ml Immunisierungsmedium (92) pipettiert. Als Antigene der in vitro Immunisierungen, aus denen die Antikörper EX-3 bis EX-6 hervorgingen, dienten 2 verschiedene Zellpräparationen differenzierter 1009-Zellen. Es wurden in einer 250ml Gewebekulturflasche adhärente, native D3-differenzierte 1009-Zellen (bei Antikörper EX-4 und EX-5) und D6,9,12-differenzierte, eingefrorene 1009-Zellen in PBS (bei Antikörper EX-3 und EX-6) in einer 250ml Gewebekulturflasche vorgelegt. 2 Tage vor der Fusion wurden Milzzellen von Balb/c-Mäusen als Füllzellen für die Hybridomzellen gewonnen, in HAT-Medium aufgenommen und auf 24-Lochplatten mit je 10^5 Zellen pro Loch und 1,5 ml verteilt.

Nach einer in vitro-Immunisierungsdauer von 3 Tagen wurden die stimulierten Rattenmilzzellen mit den Mausmyelomzellen P3X63-Ag8.653 entsprechend der Vorschrift von Frau Dr. E. Lang (91) fusioniert. $1,7 \times 10^8$ Milzzellen (Antigen: D6,9,12-differenzierte Zellen) und $1,6 \times 10^8$ Myelomzellen bzw. 5×10^7 Milzzellen (Antigen: D3-differenzierte, native

Zellen) und 5×10^7 Myelomzellen wurden gemischt und zentrifugiert. Dem trockenen Zellpellet wurde innerhalb von 1 min 1ml PEG A zugetropft und 2,5 min mit einer Glaspipette umgerührt. Dann wurden langsam 20ml serumfreies Medium zugegeben und 10 min stehengelassen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 120ml HAT-Medium aufgenommen und auf 10 24-Lochplatten à 0,5ml verteilt. Pro Loch lagen schon je 1,5ml HAT-Medium mit 10^5 Mausmilzzellen als Federzellen vor.

6.3 Aufzucht, Selektion und Klonierung der Hybridoma

Ca. 1-2 Wochen nach Fusion wurde das Wachstum der Hybridoma beobachtet. Ab diesem Zeitpunkt wurde zunächst das HAT-Selektionsmedium durch HT-Medium, d.h. ohne Aminopterin, ersetzt. Anschließend wurde gleichzeitig zunächst die Konzentration an Hypoxanthin und Thymidin und dann aller weiteren Zusätze außer FCS in Viertelschritten, $3/4$, $1/2$, $1/4$ der ursprünglichen Konzentration, heruntergesetzt.

Die Hybridomaüberstände wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf spezifische Antikörper getestet. Zunächst wurden adhärente, vitale, differenzierte 1009-Zellen entsprechend dem jeweiligen Immunisierungsmaterial getestet. Durch vergleichende Untersuchungen an undifferenzierten Zellen und differenzierten Zellen weiterer Differenzierungstage wurde die stadienspezifische Bindung überprüft.

Selektionierte Hybridoma wurden im Grenzverdünungsverfahren kloniert und rekloniert. Hierzu wurden 96-Lochplatten mit 1 Zelle pro $200\mu\text{l}$ und Loch der Platte angesetzt. Nach Expansion und Überprüfen der Antikörperproduktion wurden $1-2 \times 10^6$ Hybridomzellen in Medium mit 20% FCS und 10% DMSO zunächst 1 Tag bei -80°C und dann in flüssigem Stickstoff weggefroren.

Zur Produktion von Antikörpern in Zellkulturüberständen, wurden die Hybridomzellen in 250ml Zellkulturflaschen in DMEM mit 5-10% FCS kultiviert.

6.4 Bestimmung der Immunglobulinklasse

Antiseren:

Kaninchen-anti-Ratte IgM

Schaf-anti-Ratte IgG₁

Kaninchen-anti-Ratte IgG_{2a}

Ziege-anti-Ratte IgG_{2b}

Ziege-anti-Ratte IgG_{2c}

ICN, bezogen über BAYER

DIAGNOSTIK, München

Die Immunglobulinklasse der produzierten monoklonalen Antikörper wurde durch die Doppelimmundiffusionsmethode nach Ouchterlony (93) bestimmt. Zellkulturüberstände wurden mindestens um den Faktor 10 konzentriert und als Antigen gegen die oben aufgeführten Antiseren in 1% Indubiose-Agar (DIFCO, Detroit) in PBS eingesetzt.

7. Immunologische Tests

7.1 Immunfluoreszenz

7.1.1 Verwendete Erst- und Zweitantikörper

In Tabelle II und III sind alle verwendeten kommerziellen und zur Verfügung gestellten Erst- und Zweitantikörper mit den entsprechenden Verdünnungen aufgeführt. Die eigenen monoklonalen Antikörper wurden unverdünnt als Zellkulturüberstand (EX-1 bis EX-6) oder nach Fällung aus Ascitis (EX-1, EX-2) bzw. Fällung und Aufreinigung aus Ascitis (EX-1, II.8) in zuvor austitrierter Verdünnung eingesetzt.

Tab. II: Verwendete Erstantikörper

Antikörper	Ig-Klasse	Spezies	angew. Verdünnung	Quelle
Anti-L1 (324)	G	Ratte	1:50	Prof. M. Schachner, Institut für Neurobiologie, Heidelberg
Anti-L2 (336)	G	Ratte	1:25	Prof. M. Schachner, Institut für Neurobiologie, Heidelberg
Anti-04	M	Maus	1:50	Prof. M. Schachner, Institut für Neurobiologie, Heidelberg
Anti-NF200	G ₁	Maus	1:5	BOEHRINGER, Mannheim
Anti-NF160	G ₁	Maus	1:5	BOEHRINGER, Mannheim
Anti-NF68	G ₁	Maus	1:5	BOEHRINGER, Mannheim
Anti-GFAP	G ₁	Maus	1:10	BOEHRINGER, Mannheim
Anti-GFAP	Serum	Kaninchen	1:100	DAKOPATTS, Hamburg
Anti-Mesa-I	G _{2a}	Ratte	1:10	Prof. C. Goridis, Centre d'Immunologie, Marseille
Anti-Thy-1.2	M	Maus	1:5000	ICN, bezogen über BAYER Diagnostic München
A2B5	M	Maus	unverd.	Hybridom von American Type Culture Collection, Rockville
Anti-NCAM	G _{2a}	Ratte	1:5	Prof. C. Goridis, Centre d'Immunologie, Marseille
Anti-Vimentin	Serum	Ziege	1:1000	Prof. Jungblut, MPI f. Endokrinologie, Hannover

Tab. III: Liste der verwendeten Zweitantikörper

A: für die einfache Immunfluoreszenz

Serum	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-anti-Ratte Ig-FITC	1:50	DAKOPATTS, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus Ig-FITC	1:50	DAKOPATTS, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen Ig-FITC	1:50	DAKOPATTS, Hamburg

B: zusätzliche Zweitantikörper für die Doppelimmunfluoreszenz

Serum	Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Ratte IgG-FITC	1:20	MEDAC, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgM-Texasrot	1:50	MEDAC, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Texasrot	1:50	MEDAC, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG F(ab') ₂ -FITC	1:20	MEDAC, Hamburg

7.1.2 Geräte

Mikroskope: ZEISS Invertmikroskop IM35 mit HBO 100 W Lampe und einer OM2 Kamera von OLYMPUS
 ZEISS Standardmikroskop mit MC63 Fotozubehör und einer HBO 50 W Lampe

Optik (ZEISS): Neofluarobjektive, 25x, 40x (Ph 2)
 Plan-Neofluarobjektiv, 40x (Ph 3)
 Plan-Apochromatobjektiv, 63x (Ph 3)

Fluoreszenzfiltersätze (ZEISS): Nr 09 (Blauanregung für FITC) und Nr. 00 (Grünanregung für Texasrot)

Filme: Farbdiafilme, Ektachrome 400
 Schwarzweißfilme, Ilford HP 5 400 Asa

Ausgewertet wurden alle Immunfluoreszenzuntersuchungen an den genannten Mikroskopen mit entsprechendem Zubehör.

7.1.3 Indirekte Immunfluoreszenz auf adhärennten Zellen

Lösungen

Waschpuffer: 0,2% FCS in PBS

Antikörper-Verdünnungspuffer: 10% FCS, 0,2% NaN₃ in PBS

Eindeckmittel: 1g Polyvinylalkohol (SIGMA) wurde über Nacht bei Raumtemperatur in 7ml PBS gelöst. Dann wurden 10mg p-Phenylendiamin (SIGMA) hierin gelöst und der pH mit 0,1N NaOH auf 8 eingestellt. Nun wurden 3 ml Glycerin (für die Fluoreszenzmikroskopie, MERCK) zupipettiert und der zuvor eingestellte pH-Wert nochmal überprüft. Das Eindeckmittel wurde bei -20°C unter Lichtausschluß aufgehoben.

Fixierlösung: Ethanol : Essigsäure (95:5, v/v)

7.1.3.1 Nachweis von Zelloberflächenmarkern

Die Zellen wuchsen auf 12mm Glasdeckgläsern (ASSISTENT, bezogen über K. HECHT, Sondheim) in 24-Lochplatten bzw. Petrischalen. Die Deckgläser wurden entnommen, 1 x gewaschen und mit 50 μ l Erstantikörperlösung für 30 min bei Raumtemperatur überschichtet. Anschließend wurde 2 x gewaschen und mit dem Farbstoff-markierten Zweitantikörper ebenfalls 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es schlossen sich zwei weitere Waschvorgänge an, bevor die Zellen 5 min bei -20°C fixiert wurden. Nach weiterem Waschen wurden die Deckgläser umgekehrt auf einen Objektträger in einen Tropfen Eindeckmittel gelegt. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Deckgläser sorgfältig mit farblosem Nagellack umschlossen. Als Kontrollen dienten Ansätze mit Verdünnungspuffer anstelle der Erstantikörperlösung.

7.1.3.2 Nachweis von intrazellulären Markern

Die Durchführung erfolgte wie bei dem Nachweis extrazellulärer Marker mit der Ausnahme, daß die Zellen schon vor der 1. Antikörperinkubation fixiert und permeabilisiert wurden. Die Inkubationsdauer betrug zudem anstatt 30 min 1 h bei Raumtemperatur.

Tab. IV: Antikörpertkombinationen in der Doppelimmunfluoreszenz

Reihenfolge der verschiedenen Inkubationsschritte						
Ansatz	A2		B1		B2	
	A1					
I	eigene biotinyl. Antikörper (Ratte, IgM)	Avidin-Texasrot	Fixierung	Anti-NF68, 160 Anti-GFAP (mAK)	Ziege-anti-Maus-IgG F(ab') ₂ -FITC	./.
II	Anti-I.1 Anti-Mesa-I	Ziege-anti-Ratte IgG-FITC	Normalserum der Ratte	eigene, biotinyl. AK (Ratte, IgM)	Avidin-Texasrot	Fix.
III	Anti-Tly 1,2, A2B5	Ziege-anti-Maus IgM TR	Normalserum der Maus	eigene, biotinyl. AK (Ratte, IgM)	Avidin-FITC	Fix.
IV	eigene, biotinyl. AK (Ratte, IgM)	Avidin-FITC	Fixierung	Anti-GFAP (Serum)	Ziege-anti-Kaninchen IgG-Texasrot	./.
V	Anti-04	Kaninchen-anti-Maus Ig-FITC	Normalserum der Maus	eigene biotinyl. Antikörper (Ratte, IgM)	Avidin-Texasrot	Fix.

A: Nachweis des 1. Antigens mit Erstantikörper A1 und Nachweisreagenz A2
 B: Nachweis des 2. Antigens mit Erstantikörper B1 und Nachweisreagenz B2
 ./.: fehlende Inkubation

7.1.3.3 Indirekte Doppelimmunfluoreszenz auf adhären- Zellen

Die produzierten, monoklonalen Antikörper gehörten ausschließlich der Immunglobulinklasse M an. Da es nicht möglich war markierte Zweitantikörper mit ausreichender Spezifität gegen Ratten-IgM-Antikörper zu erwerben, wurden die eigenen Antikörper biotinyliert. Der Nachweis erfolgte mit dem Biotin-bindenden Protein Avidin, das FITC- oder Texasrot-markiert war (MEDAC, Hamburg, 1:500 Verd.). Zur Vermeidung von Kreuzreaktivitäten wurden ausschließlich die in Tab. IV aufgeführten Kombinationen verwendet. Pro Ansatz wurden jeweils 2 Kontrollen mit Verdünnungspuffer ohne je einen der Erstantikörper durchgeführt. Zwischeninkubationen mit Normalseren (1:20 Verd., 10 min) dienten ferner dazu freie Bindungsstellen auf dem Zweitantikörper zu blockieren. Ansonsten wurde entsprechend dem Protokoll zur einfachen Immunfluoreszenz vorgegangen.

7.1.4 Indirekte Immunfluoreszenz in Zellsuspension

Lösungen:

Waschpuffer: 0,5% BSA, 0,01% NaN_3 in PBS
(=Antikörperverdünnungspuffer, bei Trypsinbehandlung mit zusätzlich 10% FCS)

Fixierung: 2% p-Formaldehyd in PBS, frisch angesetzt aus einer 8%igen Stammlösung (-20°C) in PBS pH 7,2

Eindeckmittel: siehe Kap. 7.1.3, 1:2 verdünnt in PBS

Adhärenente Zellen wurden in der Flasche mit PBS gewaschen und mechanisch oder durch kurze Inkubation mit einer 0,005%igen Trypsinlösung in PBS abgelöst. Beim Ablösen der Zellen mit Trypsin wurde anschließend bis zu 20% FCS zupipettiert. Die Zellen wurden mit PBS bzw. bei der Trypsinbehandlung mit PBS mit 10% FCS gewaschen, in Waschpuffer aufgenommen, Zellzahl und der Anteil lebender Zellen bestimmt und in Eppendorfgefäße aliquotiert. Pro Ansatz wurden zwischen 10^5 und 3×10^6 Zellen je nach Differenzierungszeitpunkt zur Verfügung stehender Gesamtzellzahl verwendet. Nach einer weiteren

Zentrifugation wurden die Zellen in 100 μ l bzw. bei Zellkulturüberstand in 200 μ l Erstantikörperlösung suspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde mit 100 μ l Zweitantikörperlösung 1 h auf Eis inkubiert. Hier-nach wurden die Zellen dreimal gewaschen, 5 min auf Eis fixiert und nach erneutem Waschen in Eindeckmittel aufgenommen. Der prozentuale Anteil fluoreszierender Zellen wurde ohne Verzögerung am ZEISS-Mikroskop (Neofluarobjektiv, 40x) unter Zuhilfenahme eines Rasters, um das auszuzählende Areal zu definieren, bestimmt.

7.1.5 Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten

Lösungen:

Waschpuffer: PBS

Antikörper-Verdünnungspuffer: siehe Kap. 7.1.3

Eindeckmittel: siehe Kap. 7.1.3

Fixierlösung: siehe Kap. 7.1.4

Eingefrorene Schnitte von Mausgehirnen wurden nach dem Auftauen für 20 min bei Raumtemperatur mit 50 μ l Erstantikörper überschichtet. Nach fünfminütigem Waschen wurde 5 min auf Eis fixiert, erneut 5 min gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert. Zum Schluß wurden die Schnitte gewaschen und nach Auftropfen von Eindeckmittel und Auflegen eines Deckglases mit Nagellack eingeschlossen. Bei allen Arbeitsschritten ist darauf zu achten, daß die Schnitte nicht austrocknen. Die mikroskopische Auswertung erfolgte wie in Kap. 4.4. Als Kontrollen dienten Schnitte, die mit Verdünnungspuffer anstelle der Erstantikörperlösung inkubiert wurden.

7.2 Komplement-abhängige Zellyse

Chemikalien und Lösungen:

LOW-TOX-M Kaninchen-Complement (CAMON, Wiesbaden)

Antikörper EX-1: Ultrogel AcA22-gereinigt, 1:100 verd.

Komplement-Verd.: Das Komplement wurde entsprechend den Herstellerangaben direkt vor Gebrauch in eiskaltem dest. Wasser aufgenommen, 1:10 in Kulturmedium verdünnt und durch 0,2µm MILLIPORE GV-Filter sterilfiltriert.

1009-Zellen wurden in 24-Lochplatten auf Glasdeckgläsern kultiviert. Das Medium wurde entfernt und 400µl einer sterilen Verdünnung von Antikörper EX-1 in Kulturmedium mit den Induktoren RA und dbcAMP zupipettiert und 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit DMEM wurden 300µl der frisch angesetzten Komplementverdünnung in Kulturmedium zugegeben und weitere 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Hier-nach wurde 2 x mit DMEM gewaschen, bevor 1ml Medium zugesetzt und in Gegenwart der Induktoren weiterkultiviert wurde.

8. Reinigung der monoklonalen Antikörper EX-1, EX-3 und EX-4 über Ultrogel ACA22

Zur Produktion größerer Antikörpermengen wurde sowohl die in vitro Produktion im Zellkulturüberstand, bei Antikörper EX-3 und EX-4, als auch die in vivo Produktion in Ascitisflüssigkeit, bei Antikörper EX-1, angewendet. Bei letzterer Methode wurden LOU-Ratten ca. 14 Tage vor der Injektion der Hybridomzellen mit je 0,5ml Pristan (ROTH) i.p. behandelt. $2,5-6 \times 10^7$ Hybridomzellen in PBS wurden i.p. in die Tiere injiziert und nach 5-10 Tagen Ascitis durch Punktion der Bauchhöhle mit einer Kanüle entnommen. Nach Abzentrifugation der Zellen wurde die Flüssigkeit bis zum Gebrauch bei -80°C eingefroren.

Nach Entfernen von Zellresten aus Ascitis und Zellkulturüberständen wurden die Antikörper durch eine 50%ige $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, Zugabe des gleichen Volumens an gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung oder aliquotierte Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in fester Form, präzipitiert und durch 20minutige Zentrifugation (10000 g) gesammelt. Das Proteinpellet wurde bei den Antikörpern EX-3 und EX-4 mit 60%iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung in

PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Bei Antikörper EX-1 wurde das Proteinpellet zunächst in PBS aufgenommen, erneut eine 50%ige $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung durchgeführt und in PBS aufgenommen. Anschließend wurde über Nacht gegen PBS dialysiert. 7ml Ascitis bei Antikörper EX-1 wurden nach Fällung im gleichen Volumen PBS aufgenommen. 460ml Zellkulturüberstand wurden durch Fällung auf 14,5ml (EX-3) bzw. 12,5ml (EX-4) konzentriert.

Alle selektionierten, monoklonalen Antikörper gehörten der Immunglobulinklasse M an. Eine Affinitätsreinigung über Protein A bot sich somit nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung nicht an, da diese hieran nicht binden. Zur Anreicherung wurde ferner eine Gelfiltration über Ultrogel Aca22 durchgeführt. Bei einem Fraktionierungsbereich von 100kD bis 1200kD liegen die IgM-Antikörper mit einem Molekulargewicht von 900kD innerhalb dieses Bereichs. Auf weitere Reinigungsschritte wurde wegen der beschriebenen Labilität der IgM-Antikörper verzichtet. 6ml, bei Antikörper EX-1, bzw 8ml, bei Antikörper EX-3 und EX-4, Antikörperlösung wurde unter Verwendung von ca. 200ml Ultrogel (LKB, Freiburg) bei einem Säulendurchmesser von 1.5cm und einer Laufgeschwindigkeit von 0,1-0,15ml/min mit PBS als Laufpuffer getrennt. Ausgewählte Fraktionen wurden im Ouchterlony-Test und in der Immunfluoreszenz getestet.

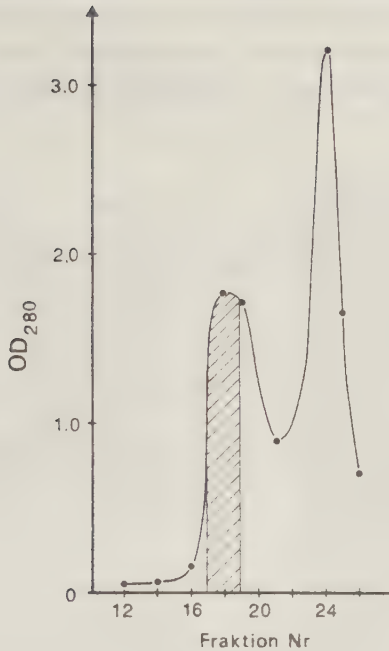


Abb. 3: Elutionsprofil von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefälltem Zellkulturüberstand mit Antikörper EX-3 über Ultrogel AcA22-Gelfiltration.

Aufgetragen wurden 8ml Proteinlösung. Das Gelvolumen betrug ca. 200ml und das Volumen der gesammelten Fraktionen 8,5ml. Der IgM-Antikörper eluierte vorwiegend im ersten Proteinpeak, wobei die markierten Fraktionen 17-19 als gereinigte Antikörperlösung eingesetzt wurden.

Die IgM-Antikörper eluierten vorwiegend in den ersten Proteinfraktionen. In der Abbildung 3 ist exemplarisch das Elutionsprofil des gefällten Antikörpers EX-3 gezeigt. Bei Antikörper EX-1 trat zusätzlich ein kleinerer Vorpeak auf, der u.a. auch EX-1-Antikörper, jedoch vermutlich aggregierte Antikörper, enthielt. Als angereicherte Antikörperfraktionen wurden für Antikörper EX-3 die Fraktionen 17-19 (Abb.3) verwendet und bei der Reinigung von Antikörper EX-1 entsprechende Fraktionen. Bei der Reinigung von Antikörper EX-4 wurde als angereicherte Antikörperlösung die Fraktion des 1. Proteinpeaks mit der größten Proteinkonzentration gewählt, um eine ansonsten für die weitere Verwendung notwendige Pro-

teinkonzentrierung zu vermeiden. Die Proteinzusammensetzung der gereinigten Antikörper und als Vergleich die des gefällten Zellkulturüberstandes und Ascitis sind nach Auftrennung in reduzierenden SDS-Gelen in Abbildung 4 gezeigt.

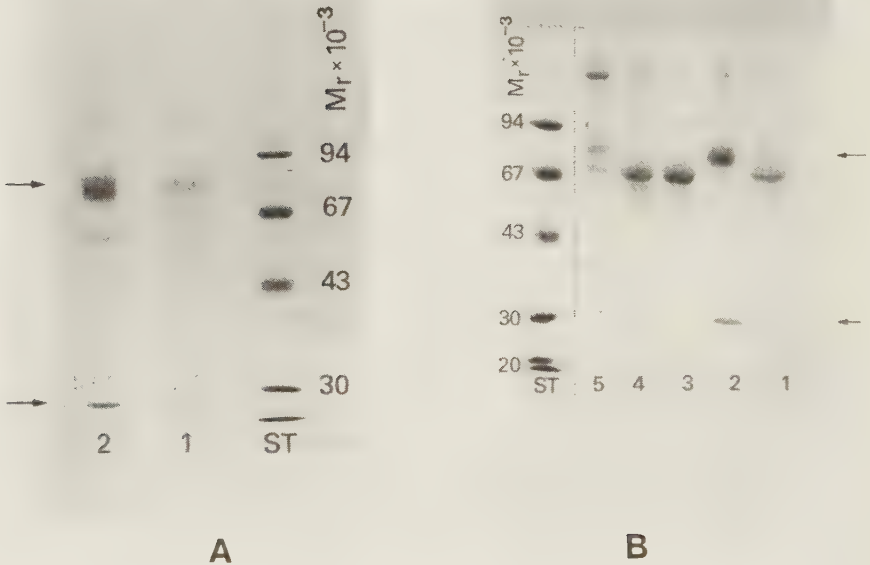


Abb. 4: 10%ige reduzierende SDS-Gele

A: SDS-Gel mit Antikörper EX-1

1 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefällter Ascitis

2 = gereinigter Antikörper nach Gelfiltration über Ultrogel Aca22

B: SDS-Gel mit den Antikörpern EX-3 und EX-4

1 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefällter Kulturüberstand von EX-3

2 = Ultrogel Aca22-gereinigter Antikörper EX-3 (Fraktion 17-19 von Abb. 3)

3 = vereinigte Fraktionen 23-25 der Ultrogel Aca22-Gelfiltration (Abb. 3)

4 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefällter Kulturüberstand von EX-4

5 = Ultrogel Aca22-gereinigter Antikörper EX-4

Aufgetragen wurde je Spur ca. 20 (A) bzw. 10-12,5 (B) μg Protein. Die Pfeile markieren die leichte und schwere Kette der IgM-Antikörper. ST = Eichproteine

9. Biotinmarkierung monoklonaler Antikörper

Chemikalien und Lösungen:

Biotin-X-NHS (CALBIOCHEM)

Dimethylformamid (SERVA)

Sephadex-G25 Medium (PHARMACIA)

Die gelchromatographisch gereinigten Antikörper EX-3 und EX-4 (Kap.8), sowie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -präzipitierter Antikörper EX-1 aus Ascitisflüssigkeit wurden in einem Verhältnis von 10:1 (Protein : Biotin-X-NHS) entsprechend dem Protokoll von Peters et al. gekoppelt (94). Durch eine Gelfiltration über eine Sephadex G25-Säule mit PBS als Laufpuffer wurde das Protein nach Kopplung vom freien Ester getrennt und anschließend gegen PBS mit 0,1% NaN_3 dialysiert. Die biotinylierten Antikörper wurden bei -20°C aliquotiert eingefroren und nur 1 x aufgetaut.

Die stadienspezifische Bindung der markierten Antikörper wurde in der indirekten Immunfluoreszenz an adhärenenten und differenzierten und differenzierten 1009-Zellen mit dem der unmarkierten Antikörper verglichen. Als Nachweisreagenzien diente Avidin-FITC bzw. ein FITC-markierter Zweitantikörper. Bei den Antikörpern EX-3 und EX-4 war nach Biotinylierung eine schwache unspezifische Bindung an das Deckglas zu beobachten. Es wurde zudem der Eindruck eines höheren Anteils fluoreszierender Zellen erweckt, was allerdings auf eine gesteigerte Testempfindlichkeit zurückzuführen sein kann (95). Eine Änderung der stadienspezifischen Expression wurde nicht beobachtet. Bei dem biotinylierten Antikörper EX-1 entsprach das Fluoreszenzmuster dem des unmarkierten Antikörpers.

10. Herstellung von 1009-Zellmembranpräparationen

Lösungen:

Puffer A: 10mM Tris/HCl pH 8,5 mit 10mM NaCl, 1mM CaCl_2 und 5mM MgCl_2

Puffer B: 1:3 Verdünnung von Puffer A

D2-differenzierte 1009 Zellen aus ca. 120 250ml Gewebekul-

turflaschen wurden mechanisch abgelöst, mit PBS gewaschen und in Puffer A aufgenommen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in Puffer B aufgenommen und bei 4°C 15 min quellen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 7 x 15 sec mit je 15 sec Pause bei Stufe 5 und 50% Effektivität unter Eiskühlung mit Ultraschall (BRANSON, Heusenstamm) behandelt. Die Zellkerne wurden bei 120g für 5 min abzentrifugiert und die Membranen im Überstand bei 100000g für 1 h pelletiert. Das Pellet wurde in Puffer B resuspendiert, homogenisiert, gegen PBS dialysiert und bis zur Verwendung bei -80°C weggefroren.

11. Enzymatische Verdauung adhärenter Zellen

Enzyme:

Trypsin (SIGMA Typ III, E.C. 3.4.21.4)

Neuraminidase (CALBIOCHEM, E.C. 3.2.1.18)

Pronase (BOEHRINGER, Proteinasegemisch)

Die Enzyme wurden in PBS, 25mg/ml Trypsin und 10mg/ml Pronase, oder TBS (96), 1U/ml Neuraminidase, gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Nach fünfminütiger Fixierung bei Raumtemperatur mit 0,25% Glutaraldehyd in PBS und gründlichem Waschen mit PBS wurden auf Glasdeckgläsern adhärenente, differenzierte 1009 Zellen mit 50µl der Enzymenverdünnungen bei 37°C verdaut. Nach gründlichem Waschen mit FCS-haltigem PBS wurde die Antikörperbindung in der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Als Kontrolle dienten nur mit Puffer vorinkubierte Zellen.

12. Allgemeine biochemische Arbeitsmethoden

12.1 Radiomarkierung von zellulären Proteinen

12.1.1 ¹²⁵J-Markierung von Membranproteinen mit Lactoperoxidase

Eine Methode, um jodierte Membranproteine mit hoher spezifischer Aktivität zu erhalten, stellt die Markierung mit Lactoperoxidase dar (97). Eine Markierung cytoplasmatischer

Proteine ist jedoch wegen eines Anteils toter Zellen in der Regel unvermeidlich.

Chemikalien und Lösungen:

Na^{125}J (AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig): 13,5mCi/ μg J,
100mCi/ml

Lactoperoxidase (SIGMA, E.C. 1.11.1.7): 1mg/ml PBS, Lagerung
bei -80°C

H_2O_2 (SIGMA): 0,03% in PBS, frisch angesetzt

Die methodische Durchführung erfolgte nach der Vorschrift von Frau Dr. E. Lang (91). Die 1009-Zellen wurden durch Abspülen mit der Pasteurpipette abgelöst, mit PBS gewaschen und in einer Zellkonzentration von $3-7 \times 10^7$ Zellen in 500 μl PBS aufgenommen. Nacheinander wurden jeweils 10 μl Na^{125}J , Lactoperoxidase und H_2O_2 -Lösung hinzupipettiert, durch Schütteln vermischt und 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde noch 2 x je 10 μl H_2O_2 -Lösung zugesetzt und für jeweils weitere 7 min inkubiert. Nach Beendigung der Markierung wurden die Zellen 5 x mit PBS gewaschen und direkt solubilisiert.

12.1.2 Metabolische Proteinmarkierung mit ^{35}S -Methionin

Chemikalien und Lösungen:

L- ^{35}S -Methionin (AMERSHAM-BUCHLER): >1000Ci/mmol

L-Met-freies DMEM (GIBCO)

FCS: dialysiert gegen PBS

Markierungsmedium: Met-freies DMEM mit 5% FCS, 2mM L-Gln und
10mM Hepes pH 7,0, (bei differenzierten 1009-
Zellen mit den Induktoren RA und dbcAMP)

Waschpuffer: PBS mit 1mM L-Met (SIGMA)

Adhärente 1009-Zellen in einer Gewebekulturflasche bzw. Kleinhirnzellen in Gewebekulturschalen wurden zunächst in Markierungsmedium ohne ^{35}S -Methionin 1 h ausgehungert. Hiernach wurde frisches Medium, 6 bzw. 3ml, mit der ^{35}S -markierten Aminosäure in Konzentrationen von 100 $\mu\text{Ci/ml}$ Medium zugesetzt. Nach einer sechsstündigen Markierung wurden die Zel-

len 2 x gewaschen und solubilisiert.

12.2 Solubilisierung der radiomarkierten Zellen

Lysispuffer:

für ^{35}S -Met-markierte Zellen: 0,5% NP-40 (FLUKA, Buchs) in
 PBS mit 1mM PMSF (SIGMA), 2 μM Leupeptin
 (SIGMA), 10 $\mu\text{g/ml}$ Trasylol (BAYER), 10mM
 L-Methionin

für ^{125}J -markierte Zellen: 1% NP-40 in PBS mit 1mM PMSF

Die Puffer wurden direkt vor der Lyse angesetzt.

Die gewaschenen jodierten Zellen wurden 30 min auf Eis in 1-1,2ml Lysispuffer solubilisiert. Die adhärenen ^{35}S -Met-markierten Zellen wurden zunächst 10 min in der Flasche oder Kulturschale mit Lysispuffer (ca. 3ml/Flasche und 1,5ml/Kulturschale) solubilisiert und nach Ablösen weitere 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliches Material wurde in der Eppendorf-Tischzentrifuge für 15 min bei 10000g pelletiert. Bei dem ^{35}S -markierten Solubilisat wurde 1 h bei 100000g und 4°C zentrifugiert.

12.3 Immunpräzipitation

Chemikalien und Lösungen:

Protein A-Sepharose 4B (PHARMACIA, Freiburg)

Kaninchen-anti-Ratte Ig (DAKOPATTS)

Waschpuffer: PBS mit 0,2% NP-40 (jodiertes Zellsolubilisat)
 PBS mit 0,25% NP-40 (^{35}S -Methionin-markiertes
 Zellsolubilisat)

Vorbereitung des Protein A-Gels:

Das Gel wurde zunächst über Nacht in PBS gequollen und mit PBS gewaschen. 500 μl Gel wurden ebenfalls über Nacht mit 500 μl Kaninchen-anti-Ratte Ig unter Schütteln inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde das gekoppelte Gel als 50%ige (v/v) Suspension mit 2,5% NaN_3 in PBS bei 4°C aufgehoben. Vor Gebrauch wurde die benötigte Menge mit PBS mit 0,2% oder

0,25% NP-40 gewaschen.

Präzipitationsprotokoll:

Das Zellsolubilisat wurde mit der Antikörperlösung (Hybridomüberstand oder einer Verdünnung des Antikörpers in Kulturmedium oder Myelomüberstand) bis zu einer Konzentration von 0,2% bis 0,25% NP-40 in 1-1.2ml Gesamtvolumen gemischt. Präzipitiert wurde durch Zugabe von 30-100 μ l einer 50%igen Lösung des gekoppelten Protein A-Gels. Inkubiert wurde jeweils 1-2 h bei 4°C im Rotierapparat (SNIJDERS, Tilburg). Nach Beendigung wurde das Gel 5 x mit NP-40-haltigem PBS gewaschen und in 50-100 μ l reduzierendem Probenpuffer für die Gelelektrophorese (Kap. 12.4) aufgenommen. Anschließend wurde 3 min gekocht und das Gel vom Überstand durch fünfminütige Zentrifugation (10000g) getrennt. Der Überstand wurde in einem SDS-Gel getrennt und ein Autoradiogramm erstellt. In einem Kontrollansatz mit Myelomkulturüberstand oder FCS-haltigem DMEM anstelle der Erstantikörperlösung wurden die unspezifisch präzipitierten Proteine bestimmt.

12.4 Eindimensionale Gelelektrophorese

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (98) getrennt.

Chemikalien und Lösungen:

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (SERVA): 30% (w/v) :

0,75% (w/v)

Trenngelpuffer (4x): 1,5M Tris HCl pH 8,6 mit 0,4% SDS

Sammelgelpuffer (4x): 0,5M Tris HCl pH 6,8 mit 0,4% SDS

Elektrolytpuffer: 25mM Tris HCl, 192mM Glycin pH ca. 8,5 mit 0,1% SDS

Probenpuffer (2x): 125mM Tris HCl pH 6,8 mit 4,6% (w/v) SDS, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin

Ammoniumpersulfatlösung: 10% (w/v) in dest. Wasser

TEMED (SIGMA)

Färbelösung: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R
in H₂O:Essigsäure:Methanol
(7:1:3, v/v))

Entfärbelösung: H₂O:Essigsäure:Methanol (6:1:4)

Eichproteine: Eichproteine, niedermolekular
(PHAMACIA)
¹⁴C-Proteinstandard (AMERSHAM
-BUCHLER, 40Ci/mmol)

Gelgröße: 14 x 12 x 0,1 cm (Breite x Höhe x Dicke)

Sammelgel:		
Acrylamid/Bisacrylamid	1,33 ml	
Sammelgelpuffer	2,5 ml	
dest. Wasser	6,07 ml	
TEMED	10µl	
Ammoniumpersulfatlösung	70µl	
Trenngel:		
Acrylamid/Bisacrylamid	7,5%	10%
Trenngelpuffer	3,75 ml	5 ml
dest. Wasser	3,75 ml	3,75 ml
TEMED	7,5 ml	6,25 ml
Ammoniumpersulfatlösung	7,5µl	7,5µl
	30µl	30µl

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer (2x) versetzt, bzw. von der Sepharose mit Probenpuffer (1x) eluiert und 3 min gekocht. Nach der Gelektrophorese wurden die Gele entweder gefärbt und entfärbt oder bei radiomarkierten Proben 30 min in Entfärbelösung fixiert. Bei β -stahlenden Isotopen wurde das Gel nach Fixierung noch fluographiert, um die Empfindlichkeit zu steigern. Dies geschah durch Imprägnieren in AMPLIFY (AMERSHAM-BUCHLER) oder durch eine PPO-DMSO-Behandlung. Bei der PPO-DMSO-Methode wurde das Gel zunächst 2 x 30 min in DMSO getränkt, dann 90 min mit einer 18%igen PPO-Lösung in DMSO behandelt und anschließend gewässert. Nach dem Trocknen wurden die Gele mit radiomarkierten Proben auf FUJI-RX-Röntgenfilmen (DUNKER, Hattingen) bei -80°C exponiert.

12.5 Immunoblotting-Technik

12.5.1 "Western-Blot"

Material und Lösungen:

Nitrocellulosepapier BA85 (SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel)
 Blotting-Papier GB002 (SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel)
 Elektroblothing-Apparatur (BIOTEC-FISCHER, Nürtingen)
 Spannungsgerät (BIOTEC-FISCHER)
 Dialysemembran (BIOTEC-FISCHER)

Transferpuffer:

A: 0,04M 6-Amino-Hexansäure, 0,025M Tris-HCl pH 9,4 mit
 20% Methanol
 B: 0,03M Tris-HCl pH 10,4 mit 20% Methanol
 C: 0,3M Tris-HCl pH 10,4 mit 20% Methanol

Proteinfärbelösung: Ponceau S-Färbereagens (SIGMA)

Die SDS-elektrophoretisch getrennten Proteine wurden in der "Halbtrocken"-Blottapparat (100), die einen schnellen, homogenen Transfer von mehreren Gelen gleichzeitig ermöglicht, im elektrischen Feld auf Nitrocellulose transferiert (99). Die Puffer-getränkten Filterpapiere wurden mit den Gelen und der Nitrocellulose in folgender Reihenfolge luftblasenfrei geschichtet:

- Pol		
6 Lagen Filterpapier in Puffer A		oberer Abschluß
Dialysemembran		
3 Lagen Filterpapier in Puffer A	}	1 Einheit
SDS-Gel		
Nitrocellulose		
3 Lagen Filterpapier in Puffer B		
6 Lagen Filterpapier in Puffer C		unterer Abschluß
+ Pol		

Bei 4°C und einer Stromstärke von 0,8mA/cm² wurden maximal 2 Gele 1 h geblottet. Hiernach wurden die an die Nitrocellulose gebundenen Proteine mit dem Ponceau-Färbereagens gefärbt und die Nitrocellulose in entsprechende Streifen geschnitten.

12.5.2 Bindung von Antikörpern an transferierte Proteine

Material und Lösungen:

Blockierlösung: 5% BSA in PBS

Inkubationspuffer: 2% BSA in PBS

Waschpuffer: 0,5% BSA in PBS

TBS: 20mM Tris pH 7,5 mit 0,5M NaCl

Protein A-POD (SIGMA)

Substratlösung für die Peroxidase: 0,015% (v/v) H_2O_2 , 0,05% (w/v) 1,4-Chlornaphthol (BIORAD) in einer Lösung aus 83% (v/v) TBS und 17% (v/v) Methanol

^{125}J -Protein A (AMERSHAM-BUCHLER, $>30mCi/mg$)

Restliche Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden 2 h bei Raumtemperatur blockiert und anschließend 3 x je 5 min mit PBS gewaschen. Mit der 1. Antikörperlösung wurde über Nacht bei 4°C bzw. 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Alle folgenden Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur, wobei nacheinander jeweils 2 h mit einem Serum (Kaninchen-anti-Ratte Ig-Serum bzw. Kaninchen-anti-Ziege Ig-FITC-Serum, 1:100 verdünnt) und mit einer Protein A-POD-Lösung (1:1000 verdünnt) inkubiert wurde. Gewaschen wurde zwischen den Inkubationen 3 x 5 min und nach der letzten Inkubation 6 x 5 min mit je zweimal PBS, PBS mit 0,2% TritonX-100 (SIGMA) und TBS. Die Nitrocellulosestreifen wurden dann 15-30 min in der Substratlösung unter Lichtabschluß entwickelt. Die Reaktion wurde durch Waschen in dest. Wasser beendet. Alternativ wurde nach der Inkubation mit der Zweitantikörperlösung auch 2 h mit einer ^{125}J -Protein A-Lösung (5×10^6 cpm/ml) inkubiert. Hiernach wurde 5 x je 15 min mit Waschpuffer inkubiert, bevor die Nitrocellulosestreifen getrocknet und Autoradiogramme erstellt wurden.

12.6 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (101) und Spektor (102). In einem Gesamttestvolumen von 1,1ml wurde 1ml Färbereagenz und 0,1ml Proteinlösung eingesetzt. Als Standardprotein diente BSA mit einem linearen Meßbereich von 1-10µg pro Ansatz.

III. ERGEBNISSE

1. Induzierte Differenzierung der EC-Zelllinie PCC7-S AzaR1 Klon 1009 (56)

Schon früher ist die von uns verwendete EC-Zelllinie als in vitro Modell der neuralen Differenzierung beschrieben worden (57,58). Ziel der Arbeiten unseres Labors ist es, dieses Modell zunächst in bezug auf die entstehenden Zelltypen qualitativ zu erfassen, um auf dieser Basis auch die Mechanismen der Induktion und Enddifferenzierung auf molekularer Ebene analysieren zu können.

Die Zellen des Klon 1009 können durch Zugabe von Retinolsäure (RA) und dbcAMP zur Differenzierung angeregt werden, so daß sie in diesem Sinne "Stammzellen" darstellen. Die Zugabe von dbcAMP erfolgt 1 Tag nach RA-Zugabe und ist mit einem Mediumwechsel verbunden. 1 Tag nach dbcAMP-Zugabe wird als Differenzierungszeitpunkt D1, 2 Tage als D2 usw. bezeichnet. In der indirekten Immunfluoreszenz wurde mittels käuflicher und von befreundeten Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellter Antisera und monoklonaler Antikörper zu verschiedenen Zeiten nach Differenzierungsinduktion mit Hilfe eines Farbstoff-gekoppelten Zweitantikörpers das Auftreten zelltypspezifischer Antigene bestimmt.

1.1 Verwendete Zellmarker

Als Indikatoren für einen bestimmten Zelltyp (Zellmarker) dienten, wie schon in der Einleitung angesprochen, membranständige Zelloberflächenmoleküle, sowie intrazelluläre Intermediärfilamente (59,60).

Im Folgenden sollen einige der zelltypspezifischen Marker vorgestellt werden, welche zur Zelltypisierung und später auch zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper herangezogen wurden (siehe auch Tab. II). Sie charakterisieren die auftretenden neuralen Zelltypen, sowie fibroblastenartige Zellen und endothelartige Zellen.

Neurone wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen das membrangebundene Glykoprotein L1 (103,104) und die Gruppe der Neurofilamente (61-63) charakterisiert. Bei den Neurofilamenten unterscheidet man drei immunologisch verschiedene Untereinheiten, 68kD, 160kD und 200kD. Die 200kD Untereinheit wird entwicklungsgeschichtlich später und unabhängig von den beiden anderen synthetisiert. Aus diesem Grund und wegen der im 1009-Zellmodell zu beobachtenden intrazellulären Kreuzreaktivitäten des spezifischen monoklonalen Antikörpers gegen die 200kD Untereinheit, wurden Antikörper gegen die kleineren Untereinheiten zur Charakterisierung herangezogen (105,106).

Astrozyten wurden auf der Basis ihrer Expression von GFAP als charakteristisches Protein der Gliafilamente bestimmt (64,65,107,108). Es wurde sowohl ein monoklonaler Antikörper (105) wie auch ein Antiserum eingesetzt.

Oligodendrozyten wurden durch die Expression der membranständigen Antigene Galactocerebrosid (109,110), das Hauptglykolipid des Myelins (111), sowie das "O-Antigen" (112) charakterisiert. Die von Dr. B. Ranscht (MIT in Cambridge MA, USA) und Prof. M. Schachner (Institut für Neurobiologie in Heidelberg) zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper anti-GalC (110) und anti-O4 (112) wurden zum Nachweis eingesetzt.

A2B5 und L2 sind zwei weitere neurale Zelloberflächenmoleküle, die jedoch im Gegensatz zu den bisher genannten Markern von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. A2B5 wird im ZNS von Vertebraten von der Mehrzahl reifer Neuronen, wenigen Astrozyten und unreifen Astrozyten- und Oligodendrozytengruppen bzw. von deren Vorläuferzellen exprimiert (15-20,113). Raff et al. zeigten zudem die Expression des Markers von den TypII Astrozyten und gemeinsamen Vorläuferzellen für TypII Astrozyten und Oligodendrozyten in Kulturen vom optischen Nerv und pränatalen Gehirn der Ratte (16-18). Im 1009-Zellmodell exprimiert die Mehrzahl der Neuronen und eine Subpopulation von Astrozyten das A2B5-Antigen (eigene

Beobachtungen). Expression von L2 ist für Neuronen und Populationen von Astrozyten und Oligodendrozyten beschrieben (104,114). Im 1009-Zellmodell wurde vorwiegend eine Expression bei neuronartigen Zellen beobachtet. Ein weiterer (seltenerer) Zelltyp, der ebenfalls L2 exprimiert, konnte nicht weiter charakterisiert werden. Zum Nachweis beider Marker wurden monoklonale Antikörper, bei A2B5 als Kulturüberstand des Hybridoms (American Type Culture Collection, zur Verfügung gestellt von Prof. M. Rajewsky, Institut für Zellbiologie in Essen), bei L2 der gereinigte entsprechende monoklonale Antikörper (Prof. M. Schachner, Institut für Neurobiologie in Heidelberg) verwendet.

Ein Antiserum gegen das Zelloberflächenmolekül Thy1, bei den 1009-Zellen als Alloantigen Thy1.2, charakterisiert fibroblastenartige Zellen. Thy1 wurde ursprünglich spezifisch für Thymozyten und T-Lymphozyten, sowie das Gehirn beschrieben (115-117). Spätere Untersuchungen zeigten, daß es im Gehirn in neuronreichen Regionen und in vitro von Fibroblasten, wenigen reifen Neuronen und Astrozyten, bei letzteren u.a. nach längerer Kultivierungsdauer exprimiert wird (13,87,118-121). Eine Bindung an gliale Zelltypen wurde im 1009-Zellmodell nicht beobachtet.

Endothelzellen wurden mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der gegen das Zelloberflächenmolekül Mesa-I gerichtet ist, nachgewiesen (122,123).

1.2 Das induzierte Differenzierungsmuster

Immunfluoreszenzstudien mit den oben genannten Zellmarkern ermöglichen die Charakterisierung eines stabilen, reproduzierbaren Differenzierungsmusters mit folgenden 4 hauptsächlichen Zelltypen (Lang E., Mazauric-Stüker M.L. & Maelicke A., Manuskript in Vorbereitung):

- neuronartige Zellen, die L1, L2, NF 68kD, NF 160kD und NF 200kD,
- astrozytenartige Zellen, die GFAP,
- fibroblastenartige Zellen, die Thy1.2, sowie
- endothelartige Zellen, die Mesa-I exprimierten.

Nach Zeitpunkt und Anteil an jeweiligen Zelltypen können verschiedene Stadien im Differenzierungsverlauf unterschieden werden. So liegt nach 2 bis 3-tägiger Induktion ein dichtes Netzwerk neuronentartiger Zellen mit charakteristischer Zellmorphologie, wie kleinem Zellkörper und langen Neuriten, vor. Ab Tag 3 nach Induktion werden zusätzlich Zellen mit flacher Morphologie beobachtet. Eine früh auftretende Population dieser Zellen läßt sich bezüglich der Markerexpression als fibroblastenartige Zellen, andere nach 5 bis 6 Tagen auftretende Populationen als astrozytenartig bzw. endothelartig charakterisieren. 5 bis 6 Tage nach Induktion bilden die flachen Zellen eine konfluente Einzellschicht, auf welcher die inzwischen aggregierten neuronentartigen Zellen wachsen. Ab Tag 8 lösen sich die neuronalen Aggregate ab, so daß fast ausschließlich die flachen Zelltypen mit nach dem Anteil vorwiegend fibroblastenartigen Zellen, gefolgt von astrozytenartigen und wenigen endothelartigen Zellen verbleiben. Oligodendrozyten und nichtneurale Zelltypen wie Muskelzellen, epitheliale und entodermale Zellen, welche sich mittels Antisera gegen die Intermediärfilamente Desmin und Keratin (59,60) sowie des monoklonalen Antikörpers TROMA-1 gegen das entodermale Cytoskelettprotein Endo A Cytokeratin (124,125) identifizieren lassen würden, konnten nicht nachgewiesen werden.

2. Die Produktion monoklonaler Antikörper

Wie in der Problemstellung erläutert, sollten monoklonale Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle hergestellt werden, die im Zelldifferenzierungsmodell stadien- und zelltypspezifisch exprimiert werden. Diese geforderten Antikörpereigenschaften stellen besondere Anforderungen an die Selektion der Antikörper. Es sollen daher zunächst Überlegungen und die entsprechenden Arbeitsschritte vorgestellt werden, die zur Erzeugung und Charakterisierung der Antikörper führten.

2.1 Strategien zur Selektion und Charakterisierung der Antikörper

Von ausschlaggebender Bedeutung für die richtige Selektion der monoklonalen Antikörper ist die Wahl eines geeigneten Testsystems. Da zur Immunisierung Antigengemische, d.h. Membranfragmente und ganze Zellen eines neuronalen Differenzierungsstadiums bzw. ganze Zellen verschiedener Differenzierungsstadien eingesetzt wurden, mußte der Test jene Antikörper aus den insgesamt produzierten Antikörpern selektionieren, die die geforderten Spezifitäten aufwiesen.

Grundvoraussetzungen eines Tests sind eine für den Verwendungszweck ausreichende Empfindlichkeit und ein nicht zu hoher Zeitaufwand. Verschiedene Tests, wie "Dot-Blot", ELISA, RIA und Immunfluoreszenz genügen zunächst diesen Anforderungen. Berücksichtigt man jedoch, daß in unserem Fall auch bei der Selektion ein Antigengemisch vorliegt, erweist sich der "Dot-Blot" als ungeeignet. Dieser Test wird meist bei reinen Antigenen angewendet, da bei einem Antigengemisch und insbesondere bei Membranproteinen die Nachweisgrenze somit gewöhnlich nicht ausreicht. Ein weiteres Problem stellt die Antigenstruktur dar, da diese durch die Bindung an die Nitrocelluloseoberfläche verändert werden kann. Der Test würde dann nur jene Antikörper selektionieren, die auch das veränderte Antigen erkennen.

Aber auch bei ELISA und RIA reicht die Konzentration bestimmter membranassoziierter Antigene nicht aus, um die gegebene Nachweisgrenze zu erreichen. Eigene Erfahrungen mit dem ELISA als selektionierendes Testsystem bestätigten diese Probleme. Erzeugte monoklonale Antikörper konnten im ELISA auf 1009-Membranfragmenten nicht nachgewiesen werden. Durch die notwendige Bindung des Antigens an eine Oberfläche kann zudem auch im ELISA und RIA die Antigenkonformation verändert werden.

Wird zudem gefordert, daß der Test ausschließlich extrazellulär bindende Antikörper selektioniert, muß auf Zellen ge-

testet werden, deren Zellmembran noch vollständig intakt (vitale Zellen) ist. Adhärente Zellen müßten dazu bei ELISA und RIA abgelöst werden. Die Verwendung von Proteasen, um einen hohen Anteil lebender Zellen zu erhalten, würde mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Verlusten von membranständigen Molekülen führen.

Um mit weitgehend nativen Zellen testen und den genannten Problemen bei der Antikörperselektion entgegen zu können, wurden die erzeugten Antikörper ausschließlich in der indirekten Immunfluoreszenz auf lebenden, adhärenen Zellen selektioniert. Weiterhin erwies es sich in unseren Untersuchungen als sinnvoll, die Hybridomklone durch den gleichen Test zu selektionieren, der auch bei der späteren Anwendung der Antikörper verwendet wurde. Die Immunfluoreszenz läßt dabei eine extrazelluläre Antikörperbindung, selbst an wenige Zellen, erkennen. Im Gegensatz zu den anderen Tests sind somit nicht nur stadienspezifische sondern bei einem Zellgemisch auch zelltypspezifische Antikörper sofort erkennbar. Trotz des hohen Zeitaufwands war die indirekte Immunfluoreszenz daher den anderen Methoden vorzuziehen.

2.2 Immunisierungen und erzeugte Antikörper

Die selektionierten Antikörper gingen aus Immunisierungen von Ratten mit dem Antigengemisch, d.h. mit Membranfragmenten bzw. ganzen Zellpräparationen differenzierter 1009-Zellen, hervor, wobei nach klassischer Methode in vivo immunisiert, oder deren Milzzellen in vitro zur Immunantwort stimuliert wurden. Die in vitro Immunisierung wurde angewendet, um lange Immunisierungszeiträume zu sparen. Ferner ist beschrieben, daß bei der in vitro Immunisierung auch gegen schwach immunogene Antigene Antikörper produziert werden (126). Weiterhin unterliegt das Antigen nicht einem vergleichbar hohen proteolytischen Abbau wie bei der in vivo Immunisierung. Es werden somit eher Antikörper gegen das unveränderte Antigen produziert. Da die beiden Immunisierungsmethoden nicht systematisch getestet wurden, können jedoch anhand eigener Ergebnisse keine quantitativen Vergleiche ge-

zogen werden. Fusionen nach in vitro Immunisierung mit der Mausmyelomzelllinie P3X63-Ag.653 wurden durchgeführt, um die Ausbeute an gewachsenen Hybridoma bei den zuvor durchgeführten Ratte/Ratte-Fusionen nach in vivo Immunisierungen zu erhöhen.

Die wachsenden Hybridoma wurden wie folgt selektioniert: Auf Glasdeckgläschen gewachsene 1009-Zellen wurden differenziert und die Hybridomüberstände in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem Farbstoff-gekoppelten Zweitantikörper getestet. Der Differenzierungszeitpunkt entsprach dabei dem der Antigenpräparation. In diesem Test positive Überstände wurden zum Vergleich auf anderen Differenzierungsstadien getestet, um die Stadienspezifität der Antikörper zu erkennen.

In Tabelle V sind die in dieser Arbeit vorgestellten sechs stadienspezifischen, monoklonalen Antikörper aufgelistet. Selektionierte Hybridoma wurden zweimal kloniert. Dabei änderte sich bei keinem der Antikörper dessen Antigenspezifität, so daß wohl bereits die ursprünglichen Hybridzellen klonal vorlagen.

Tab. V: Selektionierte monoklonale Antikörper

stadienspezifisch, extrazellulär bindende Antikörper						
Bezeichnung	Laborcode	Ig Klasse	Immunisierung	angebotenes Antigen	Myelomzelllinie	gewachsene Hybridoma
EX-1	13G107E4	M	in vivo	D2, Membranfragmente	Y3-Ag1.2.3	98
EX-2	12B23D	M	in vivo	D2, Membranfragmente	Y3-Ag1.2.3	*
EX-3	2D2D7G5	M	in vitro	D6,D9,D12, eingefrorene Zellen	P3X63-Ag8.653	98
EX-6	6C5B5D3	M	in vitro	D6,D9,D12, eingefrorene Zellen	P3X63-Ag8.653	*
EX-4	26D4D10E3	M	in vitro	D3, native Zellen	P3X63-Ag8.653	182
EX-5	23A4H11C2	M	in vitro	D3, native Zellen	P3X63-Ag8.653	*

Angebotenes Antigen war stets zur Differenzierung induziertes Zellmaterial des Klon 1009. Die Antikörper EX-1 und EX-2, EX-3 und EX-6, EX-4 und EX-5 entstammen je einer Fusion (siehe II.6.2), wobei in der letzten Spalte die Anzahl der

Die Ouchterlony-Immunpräzipitation charakterisierte alle selektionierten Antikörper als Immunglobuline der Klasse M. Für einige Experimente war eine Teilreinigung der Antikörper erforderlich. Ausgegangen wurde hierzu bei dem Antikörper EX-1 von Ascitis bzw. bei den Antikörpern EX-3 und EX-4 von Zellkulturüberstand (siehe Kap. II.8).

Weitere Arbeitsschritte waren neben der Charakterisierung der Antikörper im EC-Zelldifferenzierungsmodell die Überprüfung der Gewebespezifität auf Zelllinien verschiedenen Zelltyps, die Charakterisierung des Antigen-exprimierenden Zelltyps im 1009-Zellmodell und, bei einigen Antikörpern, in Gehirnprimärkulturen mittels etablierter Zellmarker. Es folgten Untersuchungen zur in vivo Antigenverteilung in Gehirnschnitten, die Antigenanalyse und letztendlich die Anwendung der Antikörper zur Charakterisierung unseres in vitro Modells der neuralen Differenzierung.

3. Zelluläre Lokalisation der durch die monoklonalen Antikörper EX-1 bis EX-6 markierten Antigene

Zur detaillierten Charakterisierung der zellulären Lokalisation der entsprechenden Antigene wurde die Bindung der Antikörper, wie schon bei der Selektion, vorwiegend mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Bei der einfachen Immunfluoreszenz wurde dazu in der Regel ein FITC-konjugiertes Kaninchenserum-anti-Ratte Ig zum Nachweis eingesetzt. Bei Doppelimmunfluoreszenzstudien wurde der eigene Antikörper biotinyliert und mit Farbstoff-konjugiertem Avidin nachgewiesen. Teilweise wurde neben diesen qualitativen Untersuchungen die quantitative Bindung an abgelöste Zellen in Suspension in der Immunfluoreszenz bestimmt. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt, wobei der Antikörper EX-1 zunächst exemplarisch für alle anderen behandelt wird. Hierdurch soll auch seine hohe neurale Zellspezifität und die daraus resultierende Bedeutung für weitere entwicklungsbiologische Analysen hervorgehoben werden.

3.1 Eigenschaften des durch den monoklonalen Antikörper EX-1 markierten Antigens

3.1.1 Expression im Verlauf der induzierten Differenzierung von 1009-Stammzellen

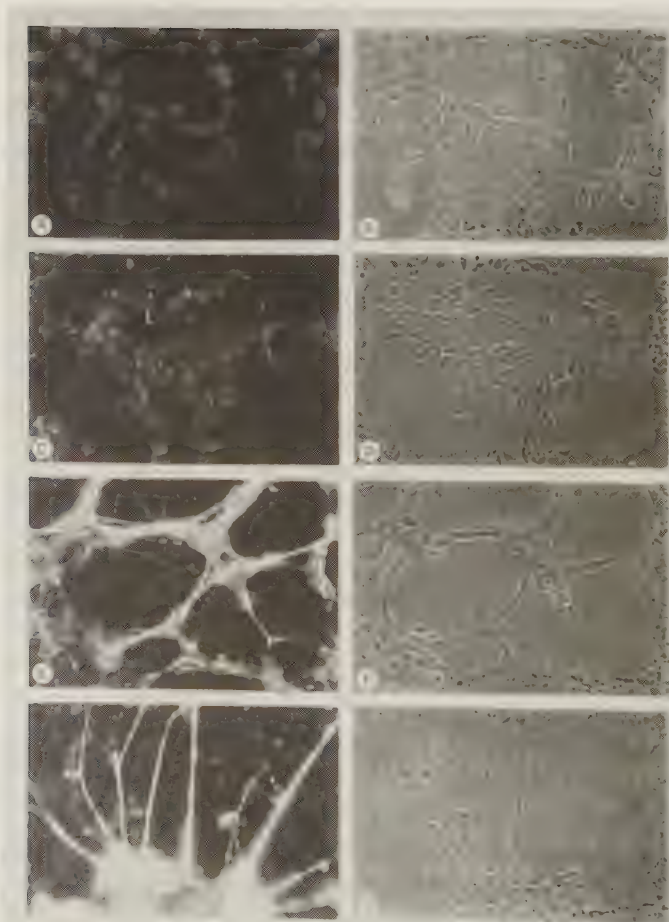
1009-Stammzellen wurden durch Zugabe von RA und dbcAMP zur Differenzierung induziert und die Bindung des Antikörpers EX-1 zu verschiedenen Zeiten getestet. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung sind in Abbildung 5 dokumentiert.

Vor Induktion exprimieren die 1009-Zellen (mit Ausnahme eines Anteils von unter 1%) das korrespondierende Antigen nicht (Abb.5: A). Bei den wenigen (in der Abb. nicht sichtbaren) positiven Zellen könnte es sich um spontan differenzierte Zellen handeln. Es wird daher davon ausgegangen, daß 1009-Stammzellen negativ sind. Nach eintägiger Stimulierung mit RA binden deutlich mehr Zellen den Antikörper. Deren Anteil sowie die Fluoreszenzintensität der positiven Zellen nimmt nach Stimulierung mit dem 2. Induktor zu. An D1 sind insbesondere Zellen mit kurzen Ausläufern positiv (Abb.5: C, beschriebene Morphologie auf Grund der hohen Zelldichte nicht zu sehen). An D2 liegt ein stark fluoreszierendes Netzwerk neuronentartiger Zellen vor (Abb.5: E). Diese aggregieren im weiteren Verlauf, wobei sie das Antigen weiterhin stark exprimieren (Abb.5: G, D5). Bis D9 lösen sich diese fluoreszierenden Aggregate in der Regel ab.

Das Differenzierungsmuster der 1009-Zellen zeichnet sich ab D3 zudem durch die Entwicklung von Zellen mit flacher Morphologie aus, die bis D5/D6 eine konfluente Einzelzellschicht gebildet haben (siehe Phasenkontrastaufnahme 5: H). An diese Zellen ist zunächst keine Bindung des Antikörpers zu beobachten. Erst ab D5 sind einzelne bzw. kleine Gruppen positiver Zellen nachzuweisen. Morphologisch können zwei Zelltypen unterschieden werden, flache, wenig verzweigte Zellen (Abb.5: I, D9) und flache, stärker verzweigte Zellen

mit kleinerem Zellkörper (Abb.5: K, D9). Zu einem späten Differenzierungszeitpunkt binden ferner einzelne Zellen mit kleinem Zellkörper und langen Ausläufern den Antikörper EX-1 (Abb.5: M, D12).

Abb. 5:



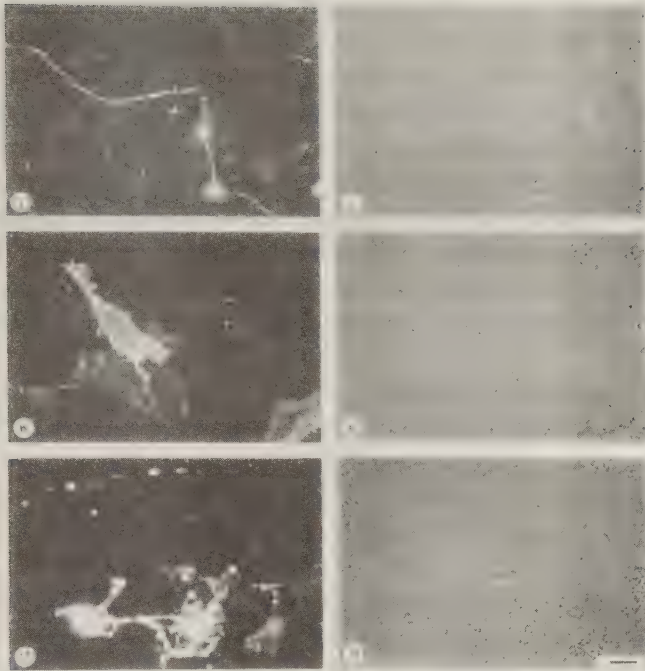


Abb. 5: Expression des korrespondierenden Antigens zu Antikörper EX-1 im Verlauf der Differenzierung von 1009-Stammzellen mit den Induktoren RA und dbcAMP. Der Nachweis der Bindung von Antikörper EX-1 erfolgte in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Getestet wurden Stammzellen (A,B) und die differenzierten Zellen an den Differenzierungstagen D1 (C,D), D2 (E,F), D5 (G,H), D9 (I-L), D12 (M,N). Jeweils rechts sind die Phasenkontrastaufnahmen zu den links gezeigten Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. Der Balken in N entspricht $20\mu\text{m}$.

Die in Abb. 5 vorgestellten Bindungsstudien wurden an lebenden, adhärennten Zellen, die auf Glasdeckgläsern gewachsen waren, erstellt. Eine entsprechende Untersuchung an abgelösten Zellen mit anschließender Immunfluoreszenz in Suspension kann nun nicht zwischen verschiedenen Zelltypen unterscheiden. Mit ihr kann jedoch eine quantitative Aussage über den prozentualen Anteil positiver Zellen gemacht werden. An adhärennten Zellen ist dies wegen der oft hohen Zelldichte und des Aggregationsverhaltens nur mit großem Fehler möglich. Abb. 6 zeigt die Ergebnisse von Messungen an undifferenzierten Zellen und den 3 charakteristischen Differenzie-

rungsstadien, wie neuronales Netzwerk (D2), neuronale Aggregate auf Schicht flacher Zellen (D5) und Schicht flacher Zellen nach Ablösen der Aggregate (D9). Der Anteil EX-1-positiver Zellen nimmt von unter 1% auf undifferenzierten Zellen bis D2 auf 64% zu und fällt dann wieder auf 46% (D5) und schließlich 13% (D9) ab. Die Ergebnisse bestätigen somit den Bindungsverlauf aus Messungen an adhärennten Zellen. Aber auch bei Messungen an abgelösten Zellen erschwert insbesondere das hohe Aggregationsverhalten neuronartigen Zellen die Auswertung.

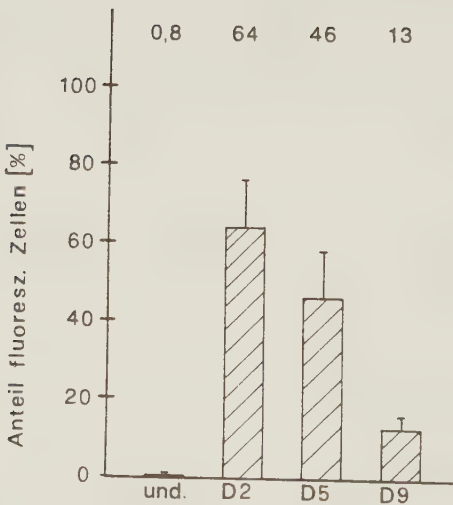


Abb. 6: Prozentualer Anteil EX-1-exprimierender Zellen in einer Suspension von undifferenzierten, sowie D2, D5, D9-differenzierten 1009-Zellen. Die adhärennten Zellen wurden durch kurzzeitige Behandlung mit Trypsin abgelöst. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Der Anteil der fluoreszierenden Zellen wurde durch Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dargestellt ist der jeweilige Anteil fluoreszierender Zellen als Mittelwert aus 2 unabhängigen Messungen mit der Meßwertbreite.

3.1.2 Untersuchungen zur Gewebespezifität des durch EX-1 markierten Antigens

Nach den bisherigen Resultaten stellte sich die Frage, ob das beschriebene Bindungsmuster verallgemeinert und somit auch an charakterisierte Zelllinien eine zelltypspezifische Bindung der Antikörper beobachtet werden kann. Anhand lebender, adhärenter Kulturen etablierter Zelllinien und Primärkulturen verschiedener Zelltypen wurde die Verbreitung des korrespondierenden Antigens untersucht (Tab.VI).

In Tabelle VI ist zu Anfang noch einmal die fehlende Expression auf Stammzellen der Expression auf Zellen des neuronalen Netzwerks (D2) gegenübergestellt. Unter 1% positive Zellen wurden bei der Diskussion der Zellspezifität in etablierten Zelllinien nicht berücksichtigt. Neuroblastom- und Gliomzelllinien exprimieren das Antigen nicht. Deren Hybridzelllinien 108CC5 und 108CC15, sowie die Hybridzelllinie NCB20, exprimieren hingegen zum Teil das Antigen. Auch wenige Zellen der getesteten entodermalen Zelllinie PFHR9 exprimieren das Antigen. Ursache für einen geringen Anteil positiver Zellen ist hier, wie auch bei den Hybridzelllinien, vermutlich das Vorhandensein eines Zellgemisches verschiedener oder verschieden weit differenzierter Zellen, die demzufolge ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen können. Die als negativ gesehenen Zellen könnten eventuell auch das Antigen in zu geringer Konzentration exprimieren, um im Test als positiv erkannt zu werden. EX-1-positive Zellen sind ferner noch in Gehirnprimärkulturen zu beobachten. Weitere Zelllinien wie Fibroblasten, Hepatomzellen, Keratinozyten, Hypophysenzellen und Pheochromocytomzellen exprimieren das Antigen nicht.

Mit Ausnahme der parietalen Entodermzelllinie PFHR9 exprimieren somit ausschließlich Zelllinien und Primärkulturen mit neuronalen Eigenschaften das Antigen. Es überrascht nicht, daß zwar die Hybridzelllinien 108CC5 und 108CC15 das EX-1-Antigen exprimieren, nicht jedoch deren Elternzelllinien das Antigen exprimieren, da bekannt ist, daß die Hybridzelllinien ver-

stärkt neuronale Eigenschaften der Neuroblastomeltern exprimieren (73,127).

Tab. VI: Bindung des Antikörpers EX-1 an etablierte Zelllinien bzw. Primärkulturen.

Zellmaterial (Zelllinien und Primärkulturen)	Zelltyp	Ergebnis
1009 (undiff.)	EC-Zellen	-
1009 (D2-diff.)	neuronale Zellen	++
NCB 20	Neurobl.-Embryohybridzellen	+ nb
108 CC15	Neurobl.-Gliomhybridzellen	+ nb
108 CC5	Neurobl.-Gliomhybridzellen	+ nb
NIE 115	Neuroblastomzellen	-
C6	Gliomzellen	-
PYS-2	entodermale Zellen	*
PFHR 9	entodermale Zellen	+
3T3	Fibroblasten	-
L929	Fibroblasten	-
GH ₃	Hypophysentumorzellen	-
MH ₃ C ₁	Hepatomzellen	-
HELIP 130	Keratinocyten	-
PC12	Pheochromocytomzellen	-
Cerebellum- primärkultur	neurale u. nicht- neurale Zelltypen	+ nb

Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz an adhärenenten Zellen mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Der prozentuale Anteil positiver Zellen wurde geschätzt.

Die Ergebnisse sind notiert als: (-) negativ (bis 1% positive Zellen wurden mit * markiert), (+) < 10% positive Zellen, (++) > 50% positive Zellen, (+nb) prozentualer Anteil positiver Zellen wurde nicht geschätzt, da hohe Zellverluste bei der Immunfluoreszenz und Zellaggregation die Auswertung erschwerten. Abkürzungen: undiff. = undifferenziert, diff = differenziert

3.1.1.3 Charakterisierung des Antigen-exprimierenden Zelltyps mit Hilfe etablierter Markermoleküle

Eine besonders elegante Methode, um in einem Zellgemisch den Antigen-exprimierenden Zelltyp zu charakterisieren, stellt die gleichzeitige Doppelmarkierung mit etablierten Markermolekülen dar. Um Kreuzreaktivitäten der in Doppelimmunfluor-

reszenzstudien eingesetzten Antikörper zu vermeiden, wurde der eigene Antikörper biotinyliert. FITC- bzw. Texasrot(TR)-konjugiertes Avidin wurde anstelle des Zweitantikörpers zum Nachweis eingesetzt. Die Reihenfolge der Inkubationsschritte für die entsprechenden Kombinationen mit Markermolekülen sind im Methodenteil (II.7.1.3.3, Tab.IV) aufgeführt. Ausgewertet wurden nur solche Areale, in denen eine eindeutige Zuordnung der Fluoreszenz zu Zellen bzw. Zellgruppen möglich war.

3.1.3.1 Doppelimmunfluoreszenzstudien im 1009-Zellmodell

Die Expression etablierter Zellmarker auf den im 1009-Differenzierungsmodell hauptsächlich auftretenden vier verschiedenen Zelltypen wurde im Vergleich zur Expression des EX-1-Antigens untersucht (Tab.VII).

Tab. VII: Doppelimmunfluoreszenzstudien des Antikörpers EX-1 mit etablierten Zellmarkern auf differenzierten Zellen der Linie 1009.

Zell-marker	charakt. Zelltyp	Differenzierungstag	Expression von EX-1
L1	Neurone	D3, D6, D8	+
NF68	Neurone	D3, D6	+
NF160	Neurone	D3, D6	+
A2B5	Neurone	D3, D5, D7	+
	Neurone, Astrozyten u.a.	D10	-/+
GFAP	Astrozyten	D7 u. später	-/+
Mesa-I	Endothelzellen	D7	-
Thy1.2	fibroblastenartige Zellen	D3	-
		D6, D9	-/+

Die Ergebnisse sind notiert als:

(+), der Antikörper bindet an die Marker-definierten Zellen; (-), der Antikörper bindet nicht an die Marker-definierten Zellen; (-/+), der Antikörper bindet an eine Subpopulation der Marker-definierten Zellen.

Im Differenzierungsstadium des neuronalen Netzwerks (D3) ist eine gute Übereinstimmung im Fluoreszenzmuster der neuronalen Marker L1, NF68 und NF160 mit dem eigenen Antikörper zu beobachten (Abb.7). Nur selten konnten EX-1-positive Ausläufer des Netzwerks ausgemacht werden, die keinen der genannten Marker exprimierten.

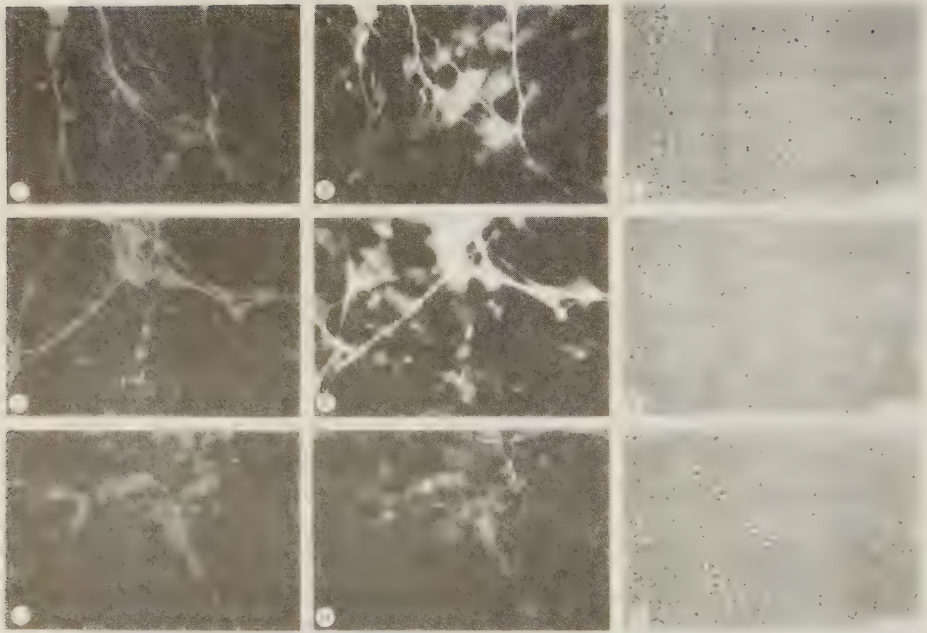


Abb. 7: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung differenzierter 1009-Zellen (Differenzierungstag 3) mit dem Antikörper EX-1 und Antikörpern gegen die neuronalen Zellmarker NF 68 (A-C), NF 160 (D-F) und L1 (G-H).

Der Nachweis der Bindung von Antikörper EX-1 erfolgte mit Texasrot-markiertem Avidin und die der etablierten Antikörper mit einem FITC-markierten Zweitantikörper. Links sind die Fluoreszenzaufnahmen mit Hilfe des Antikörpers EX-1 (A,D,G) und rechts die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (C,F,I) abgebildet. Die Balken entsprechen 20µm.

Auch zu späteren Differenzierungszeitpunkten sind die neuronalen Aggregate (Tab.VII) und einzelne L1-exprimierende neuronale Zellen EX-1-positiv (Abb.8). In Abbildung 8 sind an D6 zudem weitere EX-1-positive Zellen mit flacher Morphologie zu erkennen, die den neuronalen Marker L1 nicht exprimieren. Dieser EX-1-bindende Zelltyp wurde auch in den Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen mit den Antikörpern anti-NF 68kD und anti-NF 160kD am Differenzierungstag 6 beobachtet.



Abb. 8: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung D6-differenzierter 1009-Zellen mit den Antikörpern EX-1 und anti-L1. Nachgewiesen wurde die Antikörperbindung von EX-1 (A) mit TR-markiertem Avidin und die von anti-L1 (B) mit einem FITC-markiertem Zweitantikörper. Der Balken in der Phasenkontrastaufnahme (C) entspricht $20\mu\text{m}$.

Fibroblastenartige, d.h. Thy1.2-positive Zellen, sind zum Zeitpunkt des neuronalen Netzwerks (D3) EX-1-negativ. Erst später, hier ab D6, wenn also wie in Kap. 3.1.1 beschrieben EX-1-positive Zellen mit flacher Morphologie zu beobachten sind, exprimieren sehr wenige der fibroblastenartigen Zellen auch das EX-1-Antigen (Tab.VII). Die ausschließlich Thy1.2-positiven Zellen (Abb.9: B) überwiegen jedoch bei weitem gegenüber den ausschließlich EX-1-positiven (Abb.9: A) bzw. den Zellen die beide Antigene exprimieren (ohne Abb.).

Von den astrozytenartigen, GFAP-positiven Zellen exprimiert hingegen eine kleine Subpopulation das EX-1-Antigen (Abb.9: D,E). Oft war diese Subpopulation erst nach Medienwechsel während der Kultivierung, um Reste abgelöster, neuronaler Aggregate zu entfernen, eindeutig in Doppelimmunfluoreszenzstudien nachzuweisen.

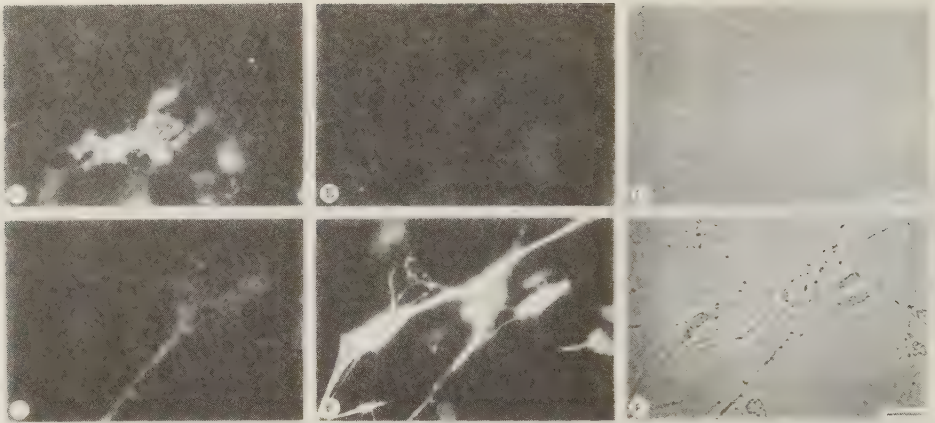


Abb. 9: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung differenzierter 1009-Zellen mit dem Antikörper EX-1 und den Antikörpern anti-Thy1.2 (A-C) und anti-GFAP (D-F). Getestet wurde am Differenzierungstag D9 (A-C) und D10 (D-F). Der Nachweis von Antikörper EX-1 erfolgte mit markiertem Avidin (A: FITC, C: TR) und von den etablierten Antikörpern mit markierten Zweitantikörpern (anti-Thy1.2: TR,B; anti-GFAP: FITC,E). Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen gezeigt (C,F). Die Balken entsprechen 20µm.

Die in der Kultur vorliegenden endothelartigen, weil Mesa-I-positiven Zellen zeigten niemals eine Expression von EX-1 (ohne Abb.).

Der neurale Zellmarker A2B5 wird im 1009-Differenzierungsansatz u.a. von neuronen- und teilweise von astrozytenartigen Zellen exprimiert. Zu frühen Differenzierungszeitpunkten sind daher alle A2B5-positiven neuronartigen Zellen auch EX-1-positiv (Abb.10: A,B). Später ist hingegen nur ein Teil der A2B5-positiven Zellen auch EX-1-positiv, d.h. die Mehrzahl der A2B5-exprimierenden Zellen mit flacher Morphologie exprimieren das EX-1-Antigen nicht (Tab.VII). Nur wenige Zellen mit flacher Morphologie exprimieren beide Marker. So ist in Abb. 10 (D-F) eine A2B5-positive Zelle mit flacher Morphologie (E) gezeigt, die EX-1-negativ (D) ist, während Zellen mit neuronalen Ausläufern beide Antigene exprimieren. Zu vermerken ist auch, daß die A2B5-Expression im Vergleich zu derjeniger anderer neuronaler Marker später erfolgt, so daß an D3 wesentlich mehr Zellen EX-1-positiv als A2B5-positiv

tiv sind. An D5 oder D6 ist dagegen eine annähernde Übereinstimmung der Fluoreszenzmuster beider Marker zu beobachten.

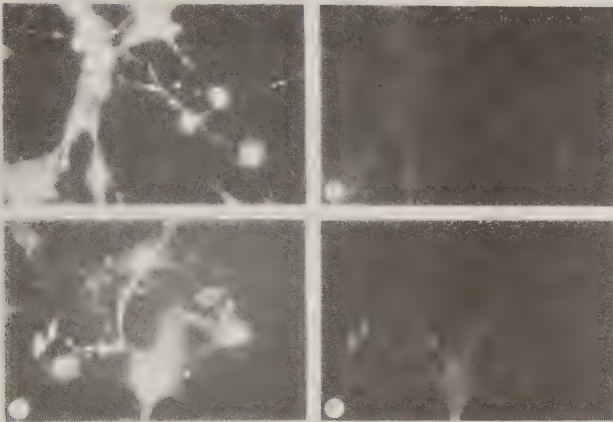


Abb. 10: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung differenzierter 1009-Zellen mit den Antikörpern EX-1 und A2B5. Getestet wurde am Differenzierungstag D5 (A-C) und D10 (D-F). Nachgewiesen wurde die Bindung von Antikörper EX-1 mit Avidin-FITC (A,D) und die von Antikörper A2B5 mit einem TR-markierten Zweitantikörper (B,E). Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen (C,F) abgebildet. Der Balken in F entspricht 20 μm .

Zusammengefaßt sichern diese Ergebnisse, daß der Antikörper EX-1 im 1009-Zellmodell vorwiegend an neuronenartige Zellen bindet. Daneben konnten einige der selteneren EX-1-exprimierenden Zellen mit flacher Morphologie als astrozyten- und fibroblastenartige Zellen charakterisiert werden.

3.1.3.2 Doppelimmunfluoreszenzstudien an Primärkulturen des Kleinhirns der Maus

Die zuvor beschriebenen Bindungsstudien wurden durch Studien an nichttransformierten, in vivo differenzierten Zellen vervollständigt. Als geeignetes neurales Gewebe wurde das Kleinhirn der Maus, welches ein leicht zu kultivierendes, neurales Gewebe mit begrenzter Anzahl gut definierter vorwiegend neuraler Zelltypen darstellt.

Kleinhirne postnataler Mäuse wurden nach Dispergierung der Zellen kultiviert und die Bindung des eigenen Antikörpers an die auftretenden neuralen Zelltypen Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten getestet (Tab.VIII). Vorhandene Makrophagen wurden anhand ihrer F_C -Rezeptoren direkt identifiziert.

Tab. VIII: Vergleich der Expression des EX-1-Antigens mit derjenigen etablierter Zellmarker in Primärkulturen des Cerebellums der neonatalen Maus.

Zelltyp	definiert durch Marker	Expression von EX-1
Neurone	L1	+
Oligodendroglia, deren Vorläufer	O4	-
Astroglia	GFAP	-

Getestet wurde nach 3 Tagen in Kultur in der indirekten Doppelimmunfluoreszenz. Die Ergebnisse sind notiert als: (+), der Antikörper EX-1 bindet an die Marker-definierten Zellen und (-), der Antikörper EX-1 bindet nicht an die Marker-definierten Zellen.

Der Antikörper EX-1 bindet an L1-positive Zellen (Abb.11: A,B), die ihrer Morphologie nach wie Körnerzellen, der vorherrschende Neuronentyp im Kleinhirn, aussehen. Oligodendrozyten (Abb.11: E) und Astrozyten (Abb. 11: H) binden hingegen den Antikörper EX-1 nicht (Abb.11: D,G). In einfachen Immunfluoreszenzen konnten zuvor nur dann eindeutig EX-1-positive Zellen beobachtet werden, wenn auch L1-positive Zellen vorhanden waren. In Primärkulturen mit Gliazellen, Oligodendrozyten und Astrozyten, aber ohne Neurone,

da sich diese bei der Immunfluoreszenz abgelöst hatten, oder in Kultur nicht überlebt hatten, wurden keine EX-1-positiven Zellen nachgewiesen, die in ihrer Morphologie wie kleine Neurone aussahen. Unklar ist noch, ob es sich bei den sel- teneren, positiven Zellen mit anderer Morphologie aus- schließlich um Makrophagen handelt.

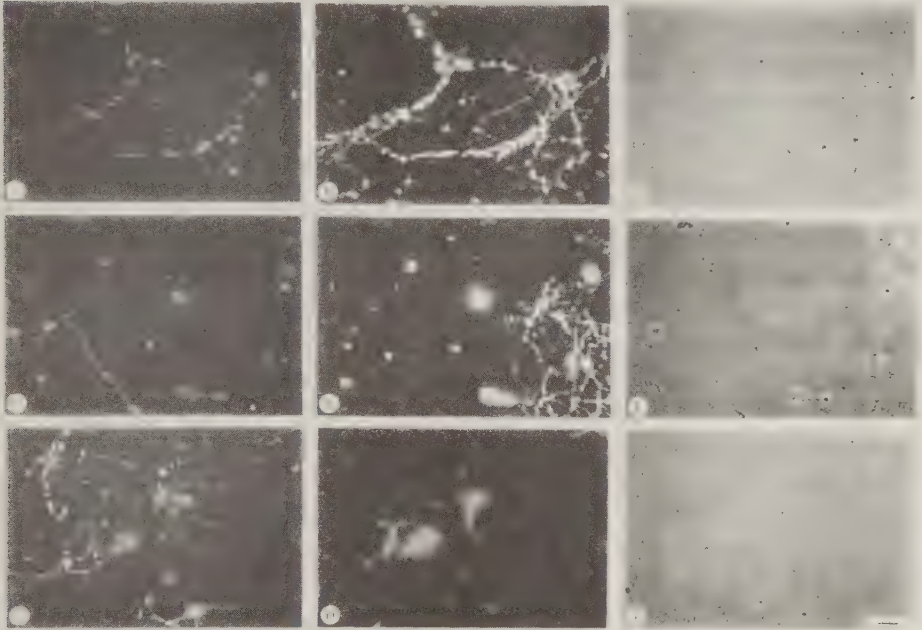


Abb. 11: Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen mit dem Antikörper EX-1 und den Antikörpern anti-L1, anti-O4 und anti-GFAP in Primärkulturen des Cerebellums der neonatalen Maus nach 3 Tagen in Kultur.

Der Nachweis von Antikörper Ex-1 (A,D,G) erfolgte mit markiertem Avidin und von den etablierten Antikörpern mit einem markierten Zweitantikörper (anti-L1: FITC,B; anti-O4 FITC,E; anti-GFAP: TR,H). Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen gezeigt. Der Balken in I entspricht 20 μm .

3.1.4 Zusammenfassung der in Kapitel 3.1 dargestellten Ergebnisse

Es wurde die zelluläre Lokalisation des EX-1-Antigens bestimmt. Indirekte Immunfluoreszenzstudien im in vitro 1009-Zelldifferenzierungsmodell, an verschiedenen Zelllinien und in Primärkulturen der Maus zeigten eine neurale Gewebespezifität. Hinsichtlich der Zellspezifität konnte in Doppelimmunfluoreszenzstudien mit Antikörpern gegen etablierte, zelltypspezifische Marker eine dominante Bindung an neuronenartige Zellen gesichert werden.

Im neuronalen Stadium des 1009-Zelldifferenzierungsmodells zeigte Antikörper EX-1 eine weitgehende Überlappung in der Fluoreszenz mit den neuronalen Zellmarkern. Doppelimmunfluoreszenzstudien mit dem neuronalen Zellmarker L1 in Kleinhirnprimärkulturen zeigten ebenfalls eine neuronale Zellspezifität. Der Antikörper EX-1 bindet im 1009-Zellmodell zusätzlich an Subpopulationen astrozyten- und fibroblastenartiger Zellen und unterscheidet sich somit von den Zellmarkern mit ausschließlich neuronaler Zellspezifität.

3.2 Eigenschaften der durch die monoklonalen Antikörper EX-2, EX-3, EX-4, EX-5 und EX-6 markierten Antigene

In gleicher Weise wie für Antikörper EX-1 exemplarisch dargestellt, wurde auch für die weiteren selektionierten Antikörper die zelluläre Expression ihrer korrespondierenden Antigene untersucht. Die prozentualen Angaben zum Anteil positiver Zellen wurden wie bei Antikörper EX-1 geschätzt.

3.2.1 Expression im Verlauf der induzierten Differenzierung von 1009-Stammzellen

3.2.1.1 Untersuchungen zu Antikörper EX-2

Der Antikörper EX-2 bindet an 50-100% (variabel in einzelnen Experimenten) undifferenzierter 1009-Zellen (Abb.12: A). Auch noch nach Induktion der Differenzierung mit RA und dbcAMP (D1) ist ein deutlicher Anteil von Zellen, auch solche mit kurzen Ausläufern fluoreszierend (Abb.12: C). An D2 exprimieren vorwiegend Zellen mit flacher Morphologie das Antigen, während neuronartige Zellen negativ sind. An D3, wenn das neuronale Netzwerk weiter ausdifferenziert ist, ist die fehlende Expression bei neuronartigen Zellen noch deutlicher zu beobachten (Abb.12: E). Dies trifft auch an späten Differenzierungstagen für deren Aggregate zu (ohne Abb.). Eine Population der Zellen mit flacher Morphologie exprimiert bereits vom Zeitpunkt des neuronalen Netzwerks an das Antigen (Abb.12: E, D3). Der Anteil positiver Zellen nimmt mit deren Auswachsen zu (siehe D7, Abb.12: G). Die Antigenexpression nimmt dann später wieder ab (siehe D12, Abb.12: I).



Abb. 12: Expression des Antigens zu Antikörper EX-2 im Verlauf der Differenzierung von 1009 Stammzellen mit den Induktoren RA und dbcAMP. Getestet wurden in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig Stammzellen (A B) und differenzierte Zellen am Tag D1 (C D), D3 (E F), D7 (G H) und D12 (I J). Jeweils rechts sind die Phasenkontrastaufnahmen zu den links abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Der Balken in J entspricht 20 μm .

3.2.1.2 Untersuchungen zu Antikörper EX-3

1009-Stammzellen exprimieren das korrespondierende Antigen nicht. Nach Induktion der Differenzierung sind ab D2 Antigen-exprimierende Zellen mit flacher Morphologie zu erkennen (siehe D3, Abb.13: A). Zellen des neuronalen Netzwerks (Abb.13: A) und deren Aggregate exprimieren das Antigen nicht. Der Anteil positiver Zellen nimmt im weiteren Differenzierungsverlauf zu (siehe D5, Abb.13: C). Schließlich exprimieren an D9 50-70% der Zellen mit flacher Morphologie das Antigen (Abb.13: E).

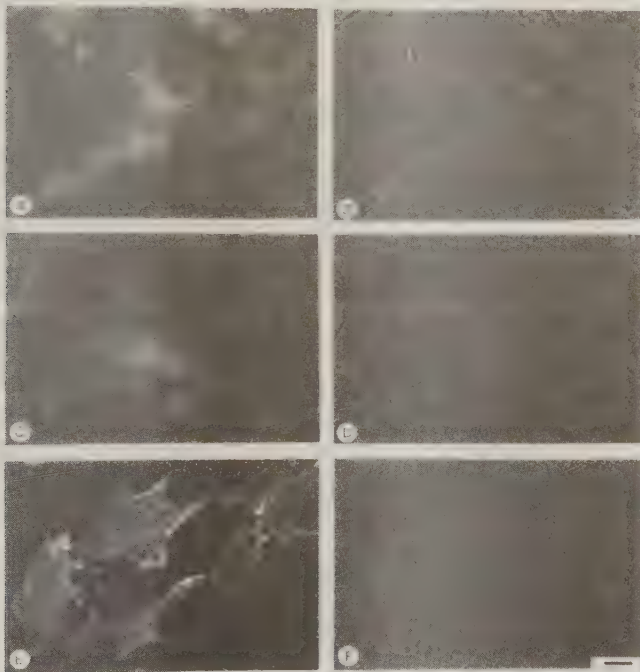


Abb. 13: Expression des Antigens zu Antikörper EX-3 in differenzierten 1009-Zellen. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz an den Differenzierungstagen D3(A,B), D5(C,D) und D9(E,F) mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zu den links abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Der Balken in F entspricht 20 μ m.

3.2.1.3 Untersuchungen zu Antikörper EX-4

Das EX-4-Antigen wird von 1009-Zellen erst nach Induktion der Differenzierung exprimiert. An D2 und D3 exprimieren Zellen mit flacher Morphologie sowie Zellen des neuronalen Netzwerks das Antigen (Abb. 14: A, D3). Der Anteil positiver Zellen nimmt im weiteren Differenzierungsverlauf zu. An D5 exprimiert ca. die Hälfte der Zellen mit flacher Morphologie das Antigen (Abb. 14: C). Auch wenige neuronale Aggregate lassen eine Fluoreszenz erkennen. An D10 mit einer Schicht flacher Zellen beträgt der Anteil positiver Zellen schließlich über 90% (Abb. 14: E).

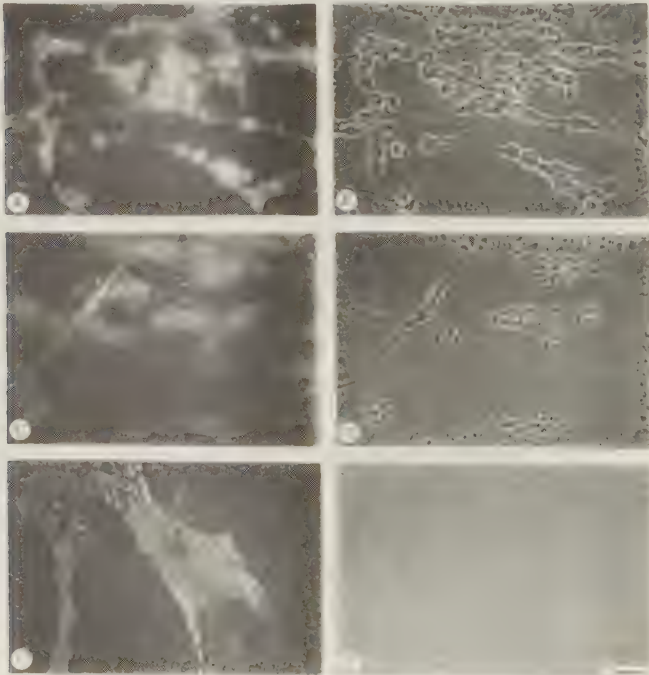


Abb. 14 Expression des Antigens zu Antikörper EX-4 in differenzierten 1009-Zellen. Gezeigt wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig an den Differenzierungstagen D3 (A,B), D5 (C,D) und D10 (E,F). Jeweils rechts sind die Phasenkontrastaufnahmen zu den Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Der Balken in F entspricht 20 μ m.

3.2.1.4 Untersuchungen zu Antikörper EX-5

Der Antikörper bindet an ca. 30-50% der undifferenzierten 1009-Zellen (Abb.15: A). Zellen des neuronalen Netzwerks (D2,D3) werden von Antikörper EX-5 nicht angefärbt. An D2 und D3 exprimieren nur wenige Zellen mit flacher Morphologie das Antigen. Deren Anteil nimmt auch mit dem Auswachsen der Zellschicht mit flacher Morphologie nicht bedeutend zu (siehe D5, Abb.15: C) und beträgt an D9 nur etwa 10-20% der Zellen (Abb.15: E).

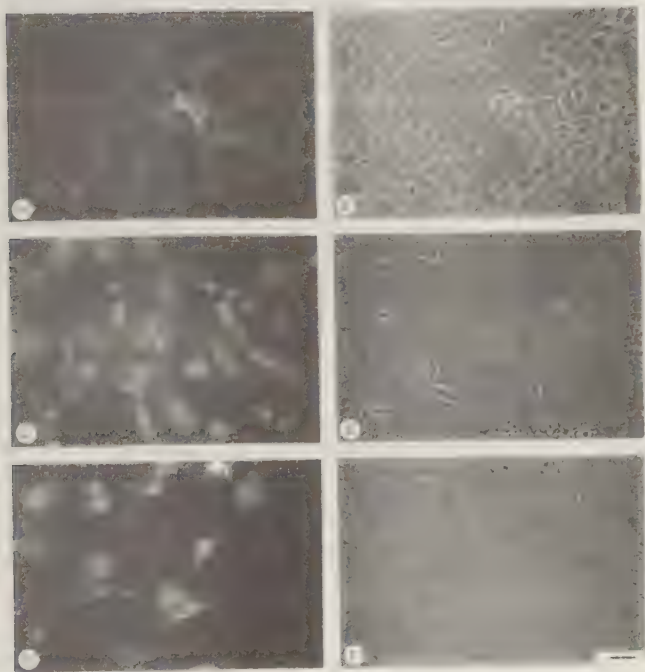


Abb. 15: Expression des Antigens zu Antikörper EX-5 in 1009-Zellen. Getestet wurden undifferenzierte (A,B) und differenzierte (D5, C,D, D9: E F) Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen zu den links abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Der Balken in F entspricht 20µm.

3.2.1.5 Untersuchungen zu Antikörper EX-6

Das korrespondierende Antigen wird weder von Stammzellen noch von neuronartigen Zellen exprimiert. Ab D3 sind wenige, positive Zellen mit flacher Morphologie zu beobachten (siehe D3, Abb.16: A), deren Anteil auch im weiteren Differenzierungsverlauf nicht wesentlich zunimmt (siehe D5, Abb. 16: C).

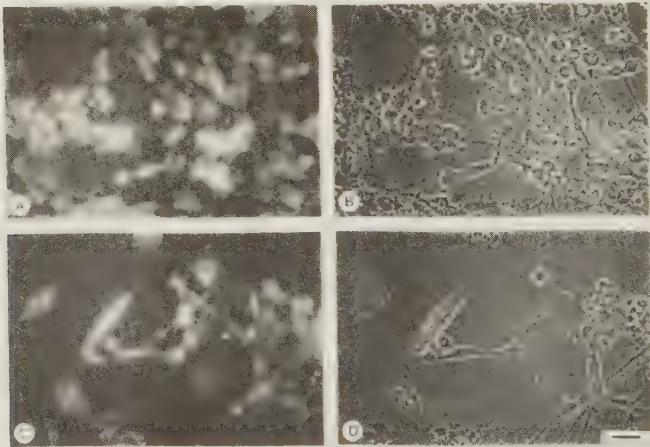


Abb. 16: Expression des Antigens zu Antikörper EX-6 in differenzierten 1009-Zellen. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz an den Differenzierungstagen D3 (A,B) und D5 (C,D) mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Jeweils rechts sind die Phasenkontrastaufnahmen zu den entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Der Balken in D entspricht 20 μ m.

3.2.1.6 Allgemeine Anmerkungen

Die in Kapitel 3.2.1.1 bis 3.2.1.5 vorgestellten Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden an lebenden Kulturen durchgeführt, d.h. die adhärenenten Zellen wurden erst im Anschluß an die Inkubationen mit Antikörper fixiert. Bei Permeabilisierung der Zellmembranen mit anschließenden Antikörperinkubationen band Antikörper EX-6 an eine kreuzreagierende, intrazelluläre Determinante. Sowohl in Stammzellen (Abb. 17: A) als auch in den differenzierten Zellen mit flacher Morpholo-

gie fluoreszieren intrazellulär fibrilläre Strukturen (siehe D3, Abb.17: C). Eine intrazelluläre Bindung in neuro-nenartigen Zellen konnte nicht gesichert werden. Bei Anti-körper EX-5 ließen sich nach vorheriger Permeabilisierung in vielen Zellen mit flacher Morphologie zusätzliche fluores-zierende Flecken in kernnahen Regionen erkennen.

Kreuzreaktivitäten extrazellulär bindender Antikörper mit intrazellulären Determinanten sind schon bei verschiedenen Antikörpern beobachtet worden, so u.a. bei den Zellmarkern N1, A2B5, und O1, O2, O3 (20,112,128). Sie ist dort nicht auf fehlende Klonalität und somit auf eine Heterogenität der Antikörperpopulation zurückzuführen. Auch weil die eigenen Hybridome rekloniert wurden, ohne daß sich die Antikörper-spezifität änderte, erscheint eine kreuzreagierende Determi-nante wahrscheinlich.

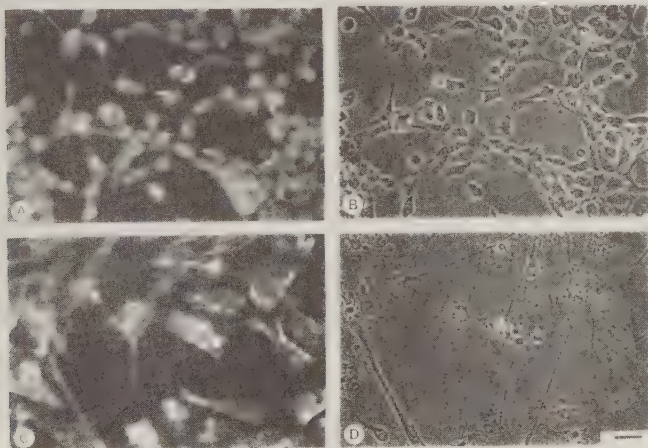


Abb. 17: Expression des Antigens zu Antikörper EX-6 in fixierten undifferenzierten (A,B) und D3-differenzierten (C,D) 1009-Zellen. Die Bindung von Antikörper EX-6 wurde in der indirekten Immunfluoreszenz für intra-zelluläre Antigene mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig nachge-wiesen. Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen gezeigt. Der Balken in D entspricht 20µm.

In adhärenenten Kulturen kann die Menge positiver Zellen nur

nach subjektiven Maßstäben quantifiziert werden, da Faktoren wie variable Zellgröße und Zellform sowie hohe Zelldichten die Auswertung erschweren. Die Antikörper EX-3 und EX-4 erwiesen sich auf Grund der im folgenden Kapitel gezeigten Ergebnisse gewebespezifischer als die anderen Antikörper. Nur mit ihnen wurde, auch auf Grund eines zuvor nachgewiesenen hohen Anteils positiver Zellen in differenzierten 1009-Zellen, Immunfluoreszenzstudien an abgelösten Zellen in Suspension durchgeführt. Getestet wurden undifferenzierte und differenzierte (D2, D5, D9) 1009-Zellen (Abb.18). Die Ergebnisse führen zum gleichen Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenz an adhärennten Zellen. Eine Expression der korrespondierenden Antigene erfolgt erst nach Induktion der Differenzierung, wobei der Anteil positiver Zellen mit zunehmender Differenzierung (D9) am größten ist.

EX-4-positive Zellen sind schon zum Zeitpunkt des neuronalen Netzwerks nachzuweisen, während EX-3-positive Zellen erst bei Vorhandensein eines hohen Anteils von Zellen mit flacher Morphologie zu beobachten sind. Der Anteil positiver Zellen an D9 ist mit 10% für Antikörper EX-3 und mit 25% für Antikörper EX-4 jedoch weitaus geringer als zuvor an adhärennten Kulturen abgeschätzt wurde. Eine Labilität der Antigene gegenüber der Trypsinbehandlung konnte als Ursache ausgeschlossen werden, weil vergleichbare Mengen positiver Zellen mit 12% für EX-3 und 21% für EX-4 auch an mechanisch abgelösten Zellen bestimmt wurden. Das Ablösen der Zellen führt daher vermutlich zu einer Konformationsänderung des Antigens oder zu einem Verlust des Antigens, was sowohl bei einem Membranmolekül als auch bei einem Molekül der extrazellulären Matrix der Fall sein kann.

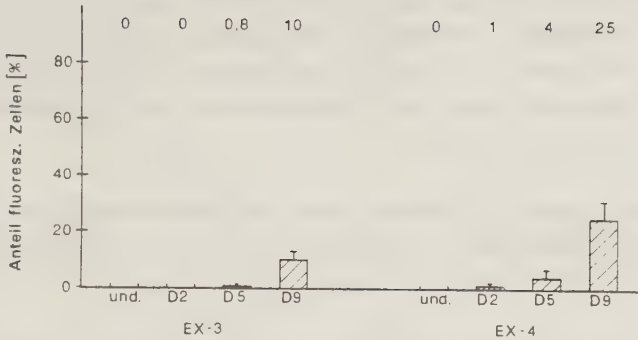


Abb. 18: Prozentualer Anteil EX-3 und EX-4 exprimierender Zellen in Zellsuspensionen von 1009-Zellen.

Die adhärenenten Zellen wurden durch kurzzeitige Behandlung mit Trypsin abgelöst. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig an undiff. (= und.) Zellen und den Differenzierungstagen D2, D5 und D9. Der Anteil fluoreszierender Zellen wurde durch Auszählen unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen sowie die Meßwertbreite.

3.2.2 Untersuchungen zur Gewebespezifität der durch die Antikörper EX-2 bis EX-6 markierten Antigene

Zur Charakterisierung der gewebespezifischen Expression der Antigene EX-2 bis EX-6 wurden Kleinhirnprimärkulturen der Maus und etablierte Zelllinien der Ratte und Maus in der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Bei letzteren wurden neben unserem Differenzierungsmodell (Daten siehe Kapitel 3.2.1) die neuralen Zelllinien NCB20, 108CC5, 108CC15, NIE115 und C6, die entodermalen Zelllinien PYS-2 und PFHR9, die Fibroblastenzelllinien 3T3 und L929, sowie Zelllinien anderer Zelltypen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle IX zusammengefaßt, wobei die relative Konzentration fluoreszierender Zellen abgeschätzt wurde.

Der Antikörper EX-2, der im 1009-Zellmodell an Stammzellen

und differenzierte Zellen mit flacher Morphologie bindet, ist auch auf Gliomzellen (C6), Fibroblasten (L929), entodermalen Zellen (PYS-2, PFHR9) und epithelialen Zellen (HELI30) positiv. Eine gewebespezifische Expression läßt sich somit nicht erkennen. Neuronale Zelllinien (NIE115, CC5, CC15, NCB20) exprimieren hingegen das Antigen nicht, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen auf neuronartigen 1009-Zellen steht (Kap. 3.2.1.1).

Der Antikörper EX-3 bindet außer an differenzierte 1009-Zellen mit flacher Morphologie nur noch an Kleinhirnprimärkulturzellen ebenfalls mit flacher Morphologie.

Ein ähnliches Bindungsmuster mit zusätzlich fluoreszierenden entodermalen PFHR9-Zellen weist der Antikörper EX-4 auf.

Der Antikörper EX-5 bindet an Kleinhirnzellen und zu einem hohen Prozentsatz an entodermale Zellen (PYS-2, PFHR9), Fibroblasten (L929), Pheochromocytomzellen (PC12) und epitheliale Zellen (HELPI30). Diese Ergebnisse lassen neben der gezeigten Antigenexpression von 1009-Stammzellen und differenzierten Zellen keine gewebespezifische Antigenexpression erkennen.

Der Antikörper EX-6 bindet an epitheliale (HELPI30) und entodermale (PFHR9) Zellen. Das intrazelluläre fibrilläre Antigen wird von den in Tab. IX aufgeführten Zelllinien mit Ausnahmen der PC12-, GH₃- und MH₁C₁-Zellen exprimiert.

Tab. IX: Bindung der Antikörper EX-2, EX-3, EX-4, EX-5 und EX-6 an verschiedene Zelllinien und Primärkulturen

Zelltyp	Zelllinien bzw. Primärkulturen	EX-2	EX-3	Antikörper EX-4	EX-5	EX-6
EC-Zellen diff. TC-Zellen (D9)	1009 1009	++ ++	- ++	- ++	+	- -+
neurale Zellen	NCB20 108 CC5 108 CC15 NIE 115 C6	- - - - ++	- - - - -	* - - - -	* - - * -	- - - - -
neurale/nichtneurale Zellen (Fibroblasten, Endothelz., meningeale Z.)	Cerebellumprimärkulturen		+nb	+nb	+nb	nt
entodermale Zellen	PYS-2 PFHR 9	++ -+	- -	- -+	++ ++	- +
Fibroblasten	3T3 L929	- ++	- -	- -	- ++	- nt
verschiedene andere Zelltypen (Hypophysen- tumor-, Hepatom-, epitheliale- und Pneuchromocytomzellen)	GH ₃ MH1Cl HELIP 130 PC12	- ++ - -	- - - -	- - - -	* - + ++	nt nt -+ nt

Gelestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig an adhärenten Zellen. Der Zelltyp und die Herkunft der verwendeten Zelllinien sind in Tab. I beschrieben.

Die Ergebnisse sind notiert als: (-) negativ (unter 1% positive Zellen wurden mit * markiert), (+) 1-10% positive Zellen, (++) 10-50% positive Zellen, (+++) 50-100% positive Zellen, (+nb) prozentualer Anteil positiver Zellen wurde wegen großem Zellverlust bei der Durchföhrung nicht bestimmt, (nt) Bindung an extrazelluläres Antigen wurde nicht gelestet. Dort wo keine Angaben gemacht wurden, ließen die Immunfluoreszenzdaten keine eindeutige Aussage zu.

3.2.3 Charakterisierung des die Antigene EX-3 und EX-4 bindenden Zelltyps mit Hilfe etablierter Markermoleküle

Die indirekten Immunfluoreszenzstudien in Kap. 3.2.2 lassen eine gewebespezifische Expression eines membranständigen Antigens nur bei den Antikörpern EX-3 und EX-4 erkennen. In Doppelimmunfluoreszenzstudien an differenzierten 1009-Zellen und Kleinhirnzellen sollte daher die Zelltypspezifität der Antigene charakterisiert werden. Als Zellmarker wurden L1, GFAP, Mesa-I und Thyl.2 herangezogen, die die 4 hauptsächlichen Zelltypen im 1009-Zelldifferenzierungsmodell neuron-, astrozyten-, endothel- und fibroblastenartige Zellen charakterisieren (Kap.1.2). Die Antikörper EX-3 und EX-4 wurden in biotinylierter Form mit markiertem Avidin, und die etablierten Zellmarker mit markierten Zweitantikörpern nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenzstudien zum Antikörper EX-3 sind in Tab. X zusammengefaßt. Neuronenartige und endothelartige 1009-Zellen, aber auch Neurone und Endothelzellen in Kleinhirnkulturen exprimieren das korrespondierende Antigen zu Antikörper EX-3 nicht. In Abb. 19 ist keine Überlappung im Fluoreszenzmuster beider Antikörperkombinationen bei differenzierten 1009-Zellen zu beobachten. Nur in seltenen Ausnahmen konnten endothelartige 1009-Zellen beobachtet werden, die zugleich das EX-3-Antigen exprimierten. Eine Subpopulation astrozytenartiger Zellen in Kleinhirnprimärkulturen, nicht jedoch in 1009-Zellen (Abb. 19), exprimiert das EX-3-Antigen. Der Anteil Thyl.2-positiver (fibroblastenartiger) 1009- und Kleinhirnzellen überwiegt gegenüber den EX-3-positiven Zellen. In beiden Kulturen exprimiert eine Subpopulation dieser das EX-3-Antigen. Speziell in 1009-Kulturen sind am getesteten Differenzierungstag D9 alle EX-3-positiven Zellen auch Thyl.2-positiv.

Tab. X: Doppelimmunfluoreszenzstudien des Antikörpers EX-3 mit etablierten Zellmarkern an differenzierten 1009-Zellen und an Kleinhirnprimärkulturzellen der neonatalen Maus.

Zellmarker	charakt. Zelltyp	Expression von EX-3 in	
		1009-Zellen	Kleinhirnprimärkulturen
L1	Neurone	-	-
GFAP	Astrogliazellen	-	-/+
Mesa-I	Endothelzellen	-	-
Thy1.2	fibroblasten- artige Zellen	-/+	-/+

Die Ergebnisse sind notiert als: (-), der Antikörper bindet nicht an die Marker-definierten Zellen; (-/+), der Antikörper bindet an eine Subpopulation der Marker-definierten Zellen.

Getestet wurde zwischen Differenzierungstag 4 und 9 bei den 1009-Zellen und an bis zu 8 Tage alten Kleinhirnprimärkulturen.

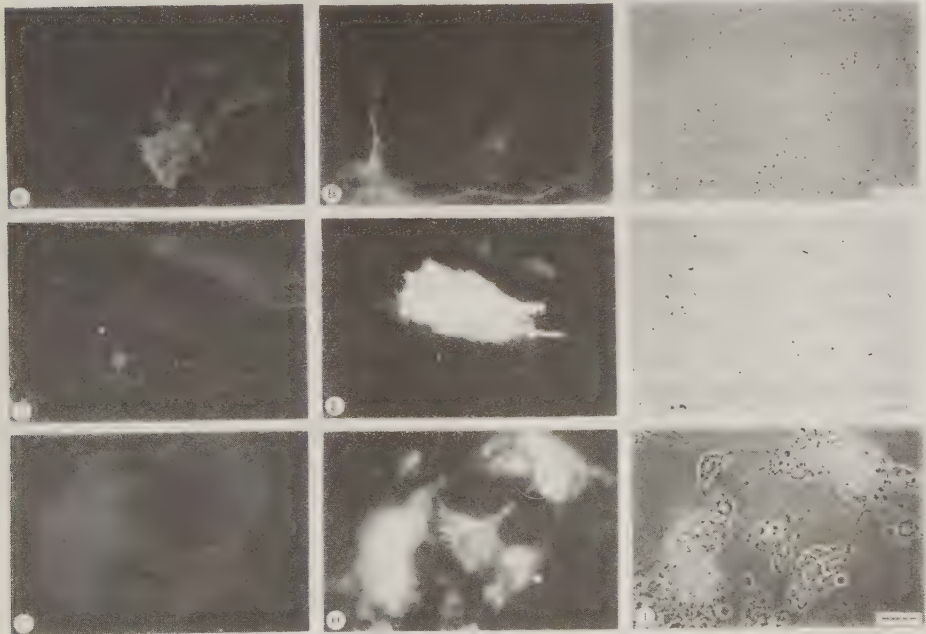


Abb. 19: Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen differenzierter 1009-Zellen mit dem Antikörper EX-3 und den Antikörpern anti-L1, anti-GFAP und anti-Mesa-I.

Der Nachweis der Bindung von Antikörper EX-3 erfolgte mit Texasrot-markiertem Avidin(A, D, G) und die Bindung der etablierten Antikörper mit FITC markierten Zweitantikörpern (L1:B, GFAP:E, Mesa-I:H). Getestet wurde an den Differenzierungstagen D6(A-C), D7(D-F) und D8(G-I). Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen gezeigt. Die Balken in C,F,I entsprechen 20 μ m.

Die Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenzstudien zu Antikörper EX-4 sind in Tabelle XI zusammengefaßt. Der Antikörper bindet an Subpopulationen der neuronen- und fibroblastenartigen Zellen im 1009-Zellmodell, nicht jedoch in den Kleinhirnprimärkulturen. Eine EX-4-Expression in einer Subpopulation endothelartiger Zellen ist in beiden Zellkulturen, bei 1009-Zellen allerdings nur in seltenen Fällen zu beobachten, während astrozytenartige Zellen den Antikörper nicht binden.

Diese Doppelimmunfluoreszenzstudien, wie auch die mit Antikörper EX-1, zeigen, daß ein direkter Vergleich zur Antigenexpression zwischen unserem 1009-Zellmodell und Kleinhirnzellen nicht bei allen Marker-charakterisierten Zelltypen möglich ist.

Tab. XI: Doppelimmunfluoreszenzstudien des Antikörpers EX-4 mit Antikörpern gegen etablierte Zellmarker an differenzierten 1009-Zellkulturen und Kleinhirnprimärkulturen der neonatalen Maus.

Zellmarker	charakt. Zelltyp	Expression von EX-4 in	
		1009-Zellen	Kleinhirnprimärkulturen
L1	Neurone	-/+	-
GFAP	Astrogliazellen	-	-
Mesa-I	Endothelzellen	-/+	-/+
Thy1.2	fibroblasten- artige Zellen	-/+	-

Die Ergebnisse sind notiert als: (-), der Antikörper EX-4 bindet nicht an die Marker-definierten Zellen; (-/+), der Antikörper bindet an eine Subpopulation der Marker-definierten Zellen. Getestet wurde zwischen Differenzierungstag 4 und 9 bei den 1009-Zellen und bei bis zu 8 Tage alten Kleinhirnprimärkulturen der Maus.

3.2.4 Zusammenfassung der in Kap. 3.2 dargestellten Ergebnisse

Es wurden 5 weitere monoklonale Antikörper EX-2 bis EX-6 vorgestellt und die zelluläre Lokalisation der korrespondierenden Antigene im 1009-Zellmodell, verschiedenen etablierten Zelllinien und in Kleinhirnkulturen der Maus getestet. Die Antikörper EX-2 und EX-5 binden an 1009-Stammzellen, an differenzierte 1009-Zellen mit flacher Morphologie und an Zellen verschiedener Zelllinien. Es handelt sich somit nicht um echte Stammzellmarker, obgleich auch der gegen einen Stammzellmarker gerichtete Antikörper anti-SSEA-1 nicht ausschließlich an frühe embryonale Zellen und EC-Zellen (so auch 1009-Stammzellen) bindet (40,129). Anti-SSEA-1 bindet auch an ein Blutgruppenantigen auf Erythrozyten, somit differenzierten Zellen, wobei als Antigendeterminante ein Kohlenhydratrest von Glykolipiden vorliegt (130,131).

Der Antikörper EX-6 bindet an wenige differenzierte 1009-Zellen mit flacher Morphologie, aber daneben zusätzlich bei 1009-Stammzellen und differenzierten Zellen mit flacher Morphologie an ein intrazelluläres Cytoskelettmolekül, das zugleich von der Mehrzahl der getesteten Zelllinien exprimiert wird. Bei den Antikörpern EX-3 und EX-4 wurde eine Antigenexpression ausschließlich nach Induktion der Differenzierung im 1009-Zellmodell und in Kleinhirnzellen sowie bei Antikörper EX-4 an entodermale PFHR9-Zellen beobachtet. Doppelimmunfluoreszenzstudien charakterisierten diese bei Antikörper EX-3 als fibroblastenartige Zellen und in Kleinhirnkulturen zusätzlich als Astrozyten. Bei Antikörper EX-4 wurden diese in beiden Kulturen als Subpopulation endothelartiger Zellen und im 1009-Zellmodell andere als Subpopulation neuronaler und fibroblastenartiger Zellen charakterisiert.

4. Immunhistologische Untersuchungen zur Antigenexpression der Antikörper EX-1 bis EX-6

Um zu sichern, daß es sich bei der an Zelllinien und Primärkulturen beobachteten Antigenexpression nicht um Effekte der Zellkultivierung handelt, wurde die in situ Verteilung der korrespondierenden Antigene im Gehirn der Maus getestet. Die Bindung der Antikörper wurde in Gefrierschnitten des Maushirns verschiedener Entwicklungsstadien, der embryonalen Tage 14 und 17, der postnatalen Tage 6 und 12 bzw. 13, sowie des adulten Stadiums, in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem Kaninchenserum-anti-Ratte Ig-FITC getestet.

Eine Bindung der Antikörper EX-2, EX-3 und EX-5 konnte nicht beobachtet werden. Die Antikörper EX-1, EX-4 und EX-6 banden an definierte Strukturen, deren Spezifität im Folgenden einzeln vorgestellt werden soll. Ausgewertete Gehirnregionen werden entsprechend erläutert.

4.1 In situ Expression des EX-1-Antigens

Eine Bindung von Antikörper EX-1 wurde bei allen getesteten Entwicklungsstadien, Tag 14 und 17 der Embryonalentwicklung, postnatal Tag 6, 12 und 13, sowie im adulten Stadium beobachtet.

Die verwendeten embryonalen Gehirnschnitte gaben keinen gesamten Querschnitt durch das Gehirn wieder, so daß nicht lokalisiert werden konnte, ob Zellschichten im Haupt- oder Seitenventrikel ausgewertet wurden. Es wurden Zellschichten zur Auswertung herangezogen, in denen eine sich in Dichte und Morphologie der Zellen abgrenzende Zellschicht direkt am Ventrikel mit benachbarten Schichten zu beobachten war. Der Antikörper L1, dessen Antigenexpression im postnatalen Kleinhirn von postmitotischen Zellschichten beschrieben ist (103,104), zeigte keine Bindung an die oben beschriebene Zellschicht direkt am Ventrikel, was absichert, daß sich diese Schicht aus mitotischen Zellen zusammensetzt, und es sich um die in der Einleitung erwähnte Ventrikular- bzw.

Subventrikularschicht handelt. Eine deutliche Fluoreszenz mit Antikörper EX-1 und somit Antigenexpression ist an den embryonalen Tagen 14 und 17 nur in den postmitotischen Schichten in Richtung der Marginalschicht zu beobachten (Tag 17, Abb.20: A).

Postnatal wurde die Expression des Antigens EX-1 in Kleinhirnen untersucht. Am postnatalen Tag 6 wird das Antigen am stärksten in den weiter innen liegenden postmitotischen Schichten, schwächer in der mitotischen externen Körnerschicht exprimiert (Abb.20: B). Ein Hauptereignis in der Kleinhirnentwicklung ist zu diesem Zeitpunkt die Wanderung der Körnerzellen aus der externen Körnerschicht, als mitotische Schicht, entlang der radial orientierten Fortsätze der Bergmann-Gliazellen in die interne Körnerschicht (133-136).

Im adulten Cerebellum wird das Antigen stärker in der Körnerschicht als in der Molekularschicht exprimiert (Abb. 20: C). Zu dieser Zeit ist zudem eine deutliche Fluoreszenz in der Purkinjezellschicht zu beobachten. Auch am postnatalen Tag 13 war immer eine deutliche Fluoreszenz in der Purkinjezellschicht, jedoch nicht mehr stets eine stärkere Fluoreszenz der Körner- gegenüber der Molekularschicht zu beobachten. Die Expression des Antigens EX-1 scheint somit im Verlauf der Entwicklung reguliert zu werden. Während undifferenzierte mitotische Zellen das Antigen nur schwach exprimieren, wird das Antigen erst deutlich nach Beendigung der Proliferation, d.h. mit der Reifung der Zellen exprimiert. Möglich ist ferner, daß die am postnatalen Tag 6 beobachtete Antigenexpression der Purkinjezellen, deren Dendriten in die Molekularschicht hineinreichen, eine Fluoreszenz in dieser Schicht vortäuschen. In diesem Falle wäre eine Antigenexpression nur in der internen Körnerschicht zu vermerken.

Untersuchungen zu einem noch früheren embryonalen Zeitpunkt an Gehirnschnitten der Ratte (embryonaler Tag 11) zeigten noch keine Expression von EX-1 (persönliche Mitteilung von Frau S. Rheinhardt-Maelicke). Tag 11 der Embryonalentwick-

lung der Ratte entspricht ca. Tag $9^{1/2}$ der Mausentwicklung (132), einem Zeitpunkt, wo in vivo die ersten differenzierten Neuronen anhand der Neurofilamentexpression nachgewiesen wurden (140).

Bei allen postnatalen und adulten Schnitten wurde neben der beschriebenen Anfärbung auch eine starke Fluoreszenz der Meningen und an Bereiche um die Gefäße beobachtet. In embryonalen Schnitten ist zudem eine Fluoreszenz auf der Ventrikularschicht nach innen zum Ventrikellumen zu beobachten.

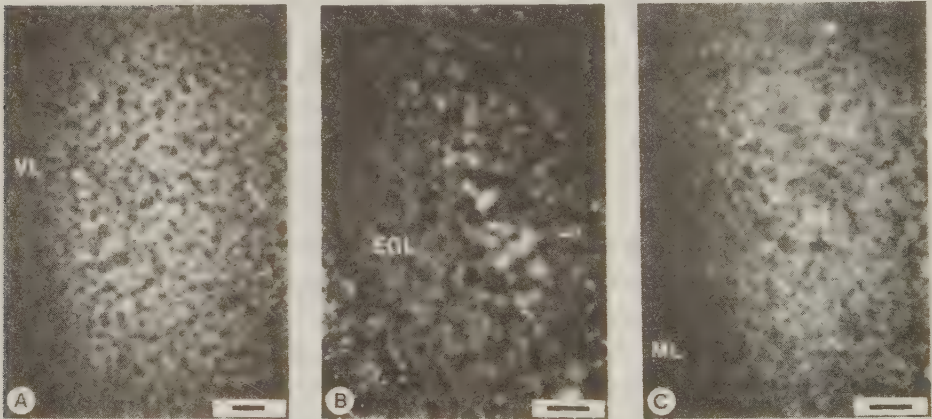


Abb. 20: Expression des EX-1 Antigens in Gefrierschnitten des embryonalen Gehirns (Tag 17, A) und des postnatalen (Tag 6, B) und adulten (C) Kleinhirns. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Es sind nur die Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Die Balken entsprechen 25 μm . Abkürzungen: VL = Ventrikularschicht, EGL = externe Körnerschicht, GL = Körnerschicht

4.2 In situ Expression des EX-4-Antigens

Immunfluoreszenzuntersuchungen an Kleinhirnprimärkulturen zeigten eine Expression des EX-4-Antigens von Zellen mit flacher Morphologie, von denen einige als Endothelzellen

charakterisiert wurden.

Das EX-4 Antigen wird in situ sowohl in den getesteten embryonalen Gehirnen als auch postnatal und im adulten Gehirn exprimiert. Dabei läßt die fädige Fluoreszenz schließen, daß ein intrazelluläres Antigen markiert wird. Im in vitro Zellsystem an etablierten Zelllinien ist jedoch gezeigt worden, daß EX-4 ausschließlich extrazellulär bindet (Abb.14). Fluoreszierende Strukturen, die anhand der Morphologie charakterisiert werden konnten, waren Gefäße (Abb. 21: A, postnatal Tag 13) und Zellen, die Ependymzellen ähneln (137) (Abb. 21: C, adult). Andere in den Schnitten beobachtete fädige fluoreszierende Strukturen konnten nicht charakterisiert werden. Die Antigenexpression in Gehirngefäßen stimmt gut überein mit der Antigenexpression in Endothelzellen des 1009-Zellmodells und in Kleinhirnprimärkulturen, charakterisiert durch Doppelimmunfluoreszenzstudien mit dem Zellmarker anti-Mesa-I. Ependymzellen wurden in den Primärkulturen nicht beobachtet, so daß hier kein Vergleich zur in situ Expression gezogen werden kann.

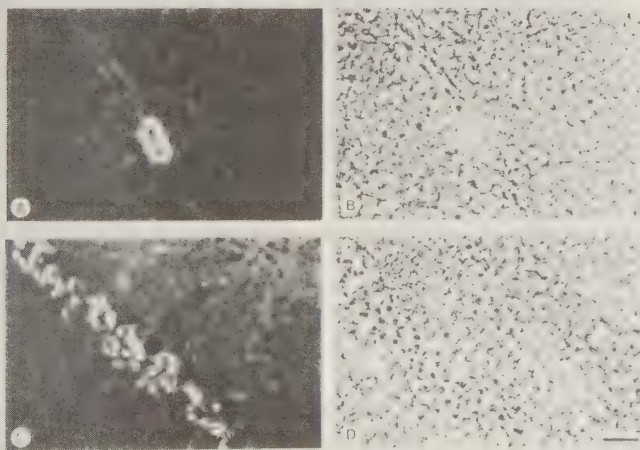


Abb. 21: Expression des EX-4 Antigens in Gefrierschnitten des postnatalen (Tag 13, A) und adulten (C) Mausgehirns. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen gezeigt. Der Balken in D entspricht 30 μ m.

4.3 In situ Expression des EX-6-Antigens

Immunfluoreszenzstudien an etablierten Zelllinien zeigten für Antikörper EX-6 eine Bindung an ein Membranmolekül wie auch an ein intrazelluläres Cytoskelettmolekül. Die in situ zu beobachtende fibrilläre Fluoreszenz läßt schließen, daß hier das intrazelluläre Molekül markiert wird. Die starke Intensität der Fluoreszenz überdeckt eine möglicherweise zu beobachtende Bindung an das membranständige Molekül. In embryonalen Schnitten wurde wie bei Antikörper EX-1 die mitotische Schicht direkt am Ventrikel mit benachbarten Schichten ausgewertet. In der Ventrikularschicht sind die fluoreszierenden Fibrillen radial angeordnet (Abb.22: A, Tag 17) und somit in Bewegungsrichtung der Zellen während Mitose und Auswanderung der Zellen in weiter außen liegende postmitotische Schichten.

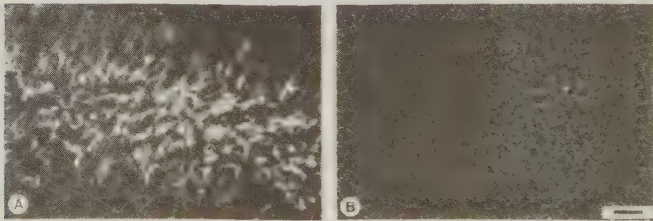


Abb. 22: Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung mit dem Antikörper EX-6 in einem Gefrierschnitt des embryonalen Mausgehirns (Tag 17). Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig. Der Balken in der Phasenkontrastaufnahme B entspricht 20 μm .

In den postnatalen und adulten Kleinhirnen können fluoreszierende Fibrillen in allen Schichten beobachtet werden. Die radial orientierten Fibrillen in der Molekularschicht entsprechen dabei dem der radial orientierten Bergmanngliazellen. Das weitere Fluoreszenzmuster auch an Bereiche um die Gefäße läßt eine vorwiegend gliale Zellspezifität vermuten. Astrozyten exprimieren als typisches Intermediärfila-

mentprotein GFAP (64,65,107,108), nachgewiesen bei der Ratte in vivo ab Tag 18 der Embryonalentwicklung (141), bzw. in vitro ab Tag 15-16 der Embryonalentwicklung (121). Vimentin, ein Intermediärfilamentprotein, welches für mesenchymales Gewebe charakteristisch ist, wird in der frühen neuralen Entwicklung von den Neuroepithelzellen und Vorläuferzellen für gliale Zellen exprimiert (60,138-140), allerdings auch von vielen reifen Astrozyten, so auch den Astrozyten aller Schichten des adulten Kleinhirns, noch koexprimiert (138). Als Antigen könnte somit neben Vimentin auch GFAP in Frage kommen.

Bindungsstudien an gereinigtem, gelelektrophoretisch getrenntem und an Nitrocellulose gebundenem Vimentin und GFAP wurden mit dem Antikörper EX-6 durchgeführt. Der Antikörper EX-6 bindet an beide Proteine, wenngleich hier wesentlich schwächer an Vimentin (Abb.23). Der Antikörper EX-6 erkennt somit vermutlich ein Epitop, das beiden Proteinen gemeinsam ist.

Abb. 23

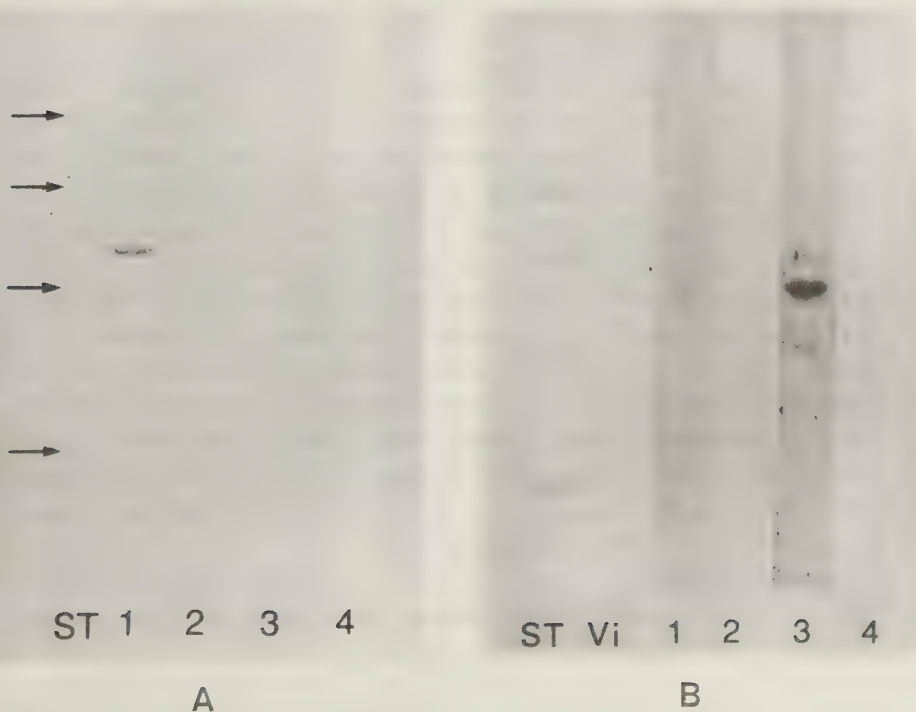


Abb. 23: Bindung von Antikörper EX-6 und einem anti-Vimentinserum an SDS-gelelektrophoretisch (10% Polyacrylamid) getrennte und auf Nitrocellulose transferierte Intermediärfilamentproteine.

A: Nitrocellulosestreifen mit GFAP (4 µg/Spur des SDS-Gels)

B: Nitrocellulosestreifen mit Vimentin (5 µg/Spur des SDS-Gels)

Bei Streifen 1 wurde mit dem Antikörper EX-6 und bei Streifen 3 mit dem anti-Vimentinserum (Prof. Jungblut, MPI für Experimentelle Endokrinologie, Hannover) inkubiert. Die Streifen 2 und 4 sind die Kontrollstreifen zu Antikörper EX-6 und dem anti-Vimentinserum. Nach Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper und Protein A-POD wurde die Antikörperbindung durch eine Farbreaktion der Peroxidase in einer Substratlösung mit 1,4-Chlornaphthol und H_2O_2 sichtbar gemacht. Die Pfeile in A markieren die Positionen der Standardproteine (ST) mit Molekulargewichten von 94, 67, 43 und 30 kD. In Abb. B sind die Standardproteine (ST) mit Ponceau-Reagenz gefärbt. Zusätzlich ist in Abb. B ein Streifen (=Vi) mit Ponceau-Reagenz-gefärbtem Vimentin gezeigt.

4.4 Zusammenfassung der Immunfluoreszenzergebnisse aller selektionierten Antikörper

Es wurde ein Repertoire an 6 monoklonalen Antikörpern hergestellt, die die zuvor geforderte Eigenschaft, Binden an differenzierte 1009-Zellen, wobei das Antigen als membranständiges Molekül stadienspezifisch bzw. zelltypspezifisch exprimiert werden sollte, zeigen. Die Antikörper lassen sich entsprechend ihrer in Immunfluoreszenzstudien untersuchten Spezifität der korrespondierenden Antigene in zwei Gruppen einteilen.

Gruppe eins umfaßt die Antikörper EX-2, EX-5 und EX-6, die an differenzierte 1009-Zellen mit flacher Morphologie binden, jedoch untereinander sowohl im quantitativen Anteil positiver Zellen als auch im Zeitpunkt der Antigenexpression Unterschiede erkennen lassen. Eine gewebespezifische Expression der Antigene wurde nicht beobachtet. So binden die Antikörper EX-2 und EX-5 zudem an 1009-Stammzellen und etablierte Zelllinien verschiedenen Zelltyps. Antikörper EX-6 bindet ferner an intrazelluläre Cytoskelettproteine, die in Immunoblotstudien als die Intermediärfilamente GFAP und Vimentin charakterisiert wurden. Gemeinsam ist den Antikörpern in dieser Gruppe, daß eine Bindung an Zelllinien neuronalen Zelltyps nicht beobachtet wurde, die Antikörper somit nichtneuronale Zellen charakterisieren.

Gruppe zwei umfaßt die Antikörper EX-1, EX-3 und EX-4, deren

Antigene im 1009-Zelldifferenzierungsmodell erst nach Induktion der Differenzierung exprimiert werden, und bei denen weiterführende Immunfluoreszenzstudien eine höhere Gewebespezifität erkennen lassen. Bei Antikörper EX-1 wurde eine vorwiegend neuronale Zellspezifität in Doppelimmunfluoreszenzstudien im 1009-Zellmodell als auch in Kleinhirnprimärkulturen charakterisiert. Immunfluoreszenzstudien an etablierten Zelllinien führten zum gleichen Ergebnis. Zudem konnte eine Expression des Antigens in situ an Gehirnschnitten gezeigt werden.

Korrespondierende Antigene zu den Antikörpern EX-3 und EX-4 werden nur von 1009-Zellen und Zellen in Kleinhirnprimärkulturen exprimiert bzw. bei Antikörper EX-4 zusätzlich von wenigen entodermalen Zellen der Zelllinie PFHR9. Auf Grund der gewebespezifischen Antikörperbindung wurden Studien zur Charakterisierung der korrespondierenden Antigene ausschließlich mit den Antikörpern der Gruppe zwei durchgeführt.

5. Untersuchungen zur molekularen Struktur der Antigene EX-1, EX-3 und EX-4

Die bisherigen Untersuchungen haben zwar die lokale Verteilung der korrespondierenden Antigene, nicht aber deren molekulare Struktur erbracht. Kenntnisse hierzu sind für die Durchführung einiger Experimente unerlässlich. So muß die Labilität des Antigens gegenüber proteolytischer Verdauung bekannt sein, wenn adhärente Zellen zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen mit Proteasen behandelt werden. Im Folgenden sind Versuche beschrieben, mit denen eingrenzende Informationen über die Antigenstruktur gewonnen werden. Die kleinste Bindungsstelle (Epitop) für einen Antikörper ist ein Peptid oder Oligosaccharid. Diese können Bestandteile eines Proteins bzw. Glykoproteins oder Glykolipids sein. Es sind nun eine Vielzahl von Methoden zur Antigencharakterisierung beschrieben, wobei im Idealfall das Antigenmolekül oder sogar das jeweilige Epitop vollständig identifiziert werden kann. Einigen dieser Methoden sind dadurch Grenzen gesetzt, daß sie nur unter denaturierenden Bedingungen anzuwenden sind. So setzt die Charakterisierung von Membranzmolekülen gewöhnlich deren Solubilisierung mit Hilfe von Detergentien voraus. Bei Proteinantigenen führt dies zu Konformationsänderungen, so daß der Antikörper unter Umständen sein Epitop nicht mehr erkennen kann. Mit verschiedenen Methoden wurde versucht, die Epitope der monoklonalen Antikörper EX-1, EX-3 und EX-4 zu charakterisieren bzw. das korrespondierende Antigen zu isolieren.

5.1 Allgemeine Tests an adhärenenten Zellen mit Hilfe von Enzymen

Erste Hinweise zur Protein- bzw. Karbohydratstruktur der Antikörper geben Tests an adhärenenten, ganzen Zellen unter Verwendung von Enzymen. Zur Modifizierung der Zelloberfläche wurden adhärenente, differenzierte 1009-Zellen verschiedenen Enzymverdauungen ausgesetzt und anschließend die Bindung der oben genannten Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz getestet (Tab.XII). Vor der Enzymverdauung wurden die ad-

härenten Zellen fixiert, um insbesondere bei der Verwendung proteolytischer Enzyme ein Ablösen der Zellen zu verhindern. Eine Fixierung mit Ethanol/Essigsäure, wie sie in der indirekten Immunfluoreszenz nach den Antikörperinkubationen verwendet wird, eignete sich nicht. Als geeignet erwies sich eine Fixierung mit Glutaraldehyd (0,25% in PBS, 5 Min, Raumtemperatur). Hiernach war noch bei den Antikörpern EX-1, EX-3 und EX-4 eine deutliche Fluoreszenz, wenngleich bei Antikörper EX-3 nur noch an zuvor stark positive Zellen, zu erkennen. Unspezifische Reaktionen nach der Proteinvernetzung durch Glutaraldehyd waren nicht zu beobachten.

Zur Modifizierung der membranständigen Proteinstruktur wurde mit den Proteasen Trypsin bzw. Pronase verdaut. Trypsin spaltet Proteine zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäuren Lysin und Arginin und benachbarten Aminosäuren (142). Pronase spaltet nahezu alle synthetischen Di- und Tripeptide (142). Die Zuckerreste der membranständigen Moleküle wurden mit Neuraminidase modifiziert. Das Enzym spaltet hydrolytisch terminale Sialinsäuren aus den Oligosaccharidseitenketten von Glykoproteinen und Glykolipiden (143). Neben den eigenen Antikörpern wurde als Kontrollantikörper A2B5, der ein Gangliosid als Antigen erkennt, getestet (19,144). Die Ergebnisse sind in Tabelle XII zusammengefaßt. Das Antigen A2B5 ist stabil gegenüber der proteolytischen Verdauung mit Trypsin bzw. Pronase. Eine Neuraminidasebehandlung führt hingegen, wie beschrieben (19,144), zu einem Verlust der Antikörperbindung. Die Epitope der eigenen Antikörper EX-1, EX-3 und EX-4 werden durch eine Neuraminidasebehandlung nicht verändert. Dies spricht somit gegen eine Beteiligung von Sialinsäuren am jeweiligen Epitop. Proteaseverdauungen führen dagegen bei den Antikörpern EX-1 und EX-4 zu einem Verlust der Bindung, was eine Proteinstruktur der Antigene vermuten läßt. Das Antigen EX-3 ist stabil gegenüber proteolytischen Verdauungen, was schließen läßt, daß kein Protein als Antigen vorliegt.

Tab. XII: Labilität der Antigene zu den Antikörpern EX-1, EX-3, EX-4 und A2B5 gegenüber Enzymverdauungen

Antigen zu mAK	Trypsin 0,25mg /ml 15min	Trypsin 0,25mg /ml 1h	Pronase 0,1mg /ml 1h	Neuraminidase 1U/ml 1h
EX-1	+	+	+	-
EX-3	-	-	-	-
EX-4	+	+	+	-
A2B5	-	-	-	+

Differenzierte 1009-Zellen wurden bei 37°C mit den aufgeführten Enzymen verdaut. Die Bindung des jeweiligen Antikörpers wurde in der indirekten Immunfluoreszenz getestet.

Die Ergebnisse sind notiert als: (+), labil gegenüber der Enzymbehandlung, (-), stabil gegenüber der Enzymbehandlung.

A2B5, für welchen ein Gangliosid als Antigen charakterisiert ist, diente als Kontrollantikörper.

5.2 Immunpräzipitationen mit den Antikörpern EX-1, EX-3 und EX-4

Eine Methode zur eindeutigen Charakterisierung der korrespondierenden Antigene als Proteine stellt die Immunpräzipitation markierter Proteine aus Zellsolubilisat dar. Zur Markierung der Zellproteine wurde die Jodierung mit Lactoperoxidase und die metabolische Markierung mit ³⁵S-Methionin angewendet. Getestet wurde mit dem Antikörper EX-1 sowohl jodiertes Zellsolubilisat D2-differenzierter 1009-Zellen und zum Vergleich undifferenzierter 1009-Zellen, als auch ³⁵S-Methionin-markiertes Zellsolubilisat D3-differenzierter 1009-Zellen und Kleinhirnzellen der Maus. Als Kontrollantikörper diente anti-NCAM (Prof. C. Goidis, Centre d'Immunologie, Marseille) bei jodiertem Solubilisat und anti-L1 (siehe Tab.II) bei ³⁵S-markiertem Solubilisat, beides monoklonale Antikörper mit Zelladhäsionsmolekülen und somit Membranmolekülen als Antigene (103,104,146), deren Expression im verwendeten Zellmaterial aus Immunfluoreszenzstudien bekannt war. In den Abb. 24 und 25 sind Autoradiogramme nach gelelektrophoretischer Trennung der Immunpräzipitate gezeigt. Experimente mit dem Antikörper EX-1 zeigten keine

Präzipitation, während Experimente mit den etablierten Antikörpern anti-NCAM und anti-L1 die für sie beschriebenen Proteine erkennen ließen.

Mit den Antikörpern EX-3 und EX-4 wurde ^{35}S -Methionin-markiertes Zellsolubilisat D7-differenzierter 1009-Zellen getestet. Eine spezifische Präzipitation war nicht zu beobachten.

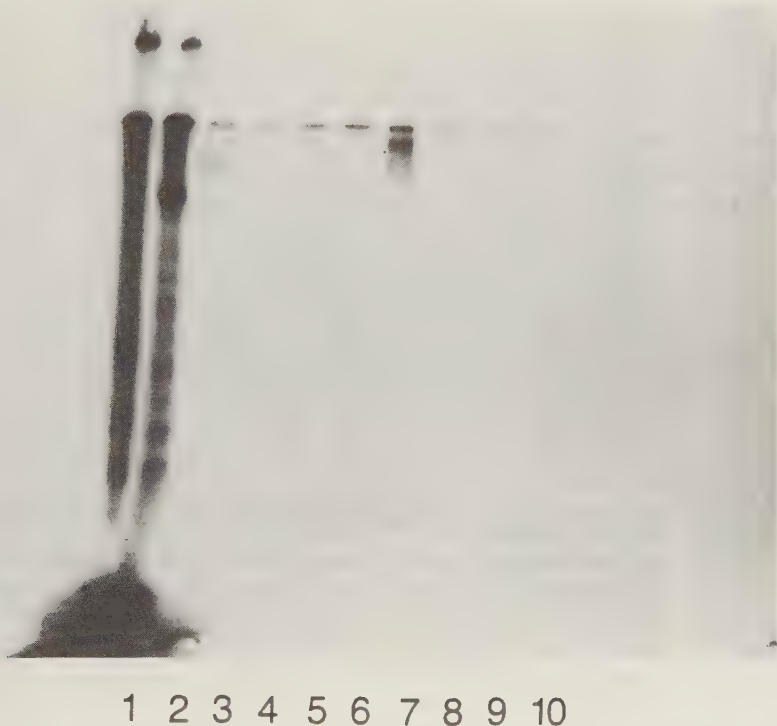


Abb. 24: 10%iges SDS-Gel von Immunpräzipitaten ^{125}J -markierter 1009-Zellsolubilisate. Solubilisat undifferenzierter (Spur 3-6) und D2-differenzierter 1009-Zellen (Spur 7-10) wurde mit den Antikörpern anti-NCAM (3,7), Myelomüberstand (4,8), sowie Zellkulturüberständen der Antikörper EX-2 (5,9) und EX-1 (6,10) inkubiert und durch Zugabe von Kaninchen-anti-Ratte Ig gebunden an Protein A Sepharose4B präzipitiert. In Spur 1 und 2 ist das Solubilisat der undifferenzierten (1) und D2-differenzierten (2) 1009-Zellen aufgetragen.

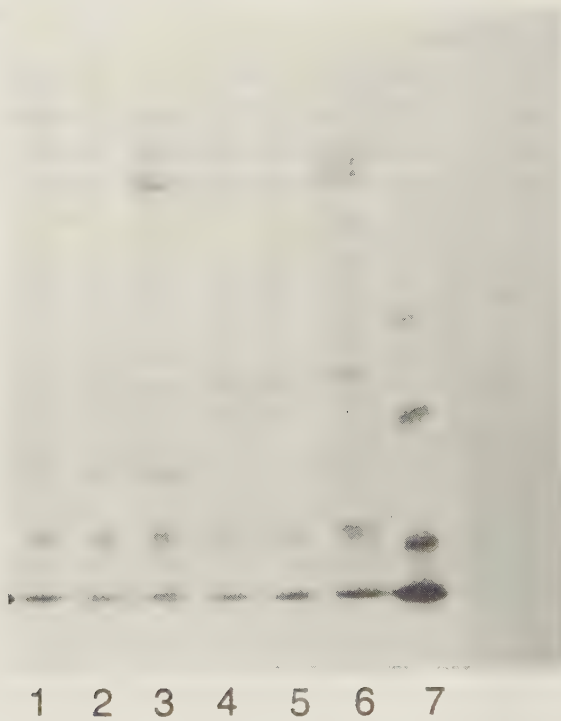


Abb. 25: 7%iges SDS-Gel von Immunpräzipitaten ^{35}S -Methionin-markierter 1009- (4-6) und Kleinhirnzellsolubilisate (1-3). Solubilisat metabolisch markierter differenzierter 1009-Zellen und Kleinhirnzellen 5 Tage alter Mäuse (Differenzierungstag D3 bzw. 4 Tage in Kultur nach Beendigung der Markierung) wurde mit dem Antikörper anti-L1 (3.6) und EX-1 (2.5) inkubiert. Präzipitiert wurde durch Zugabe von Kaninchen-anti-Ratte Ig gebunden an Protein A Sepharose4B. In Spur 1 und 4 sind die in einem Kontrollansatz unspezifisch präzipitierten Proteine aufgetragen. In Spur 7 sind ^{14}C -markierte Eichproteine mit Molekulargewichten von 200, 93, 69 und 46 kD getrennt.

5.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 5

In Kap. 5 sind Versuche aufgeführt, die Hinweise zur molekularen Struktur der Antigene zu den Antikörpern EX-1, EX-3 und EX-4 geben. Enzymverdauungen an adhärenenten Zellen weisen bei den Antikörpern EX-1 und EX-4 aufgrund der Labilität der korrespondierenden Antigene gegenüber Proteasen auf eine Proteinstruktur dieser hin. Die Beteiligung von Sialinsäuren

an der antigenen Determinante eines Glykoproteins kann wegen der Stabilität gegenüber der Neuraminidasebehandlung ausgeschlossen werden. Eine Immunpräzipitation markierter Proteine konnte mit Antikörper EX-1 und EX-4 nicht gezeigt werden. Bei Antikörper EX-3 zeigte sich eine Stabilität des Antigens gegenüber Protease- als auch Neuraminidaseverdauung. Diese Stabilität gegenüber Proteasen und die fehlende Immunpräzipitation markierter Proteine deuten auf ein Glykolipid als Antigen hin.

Zu beachten ist, daß bei der Immunpräzipitation stets von Solubilisat ausgegangen wurde, was zu Konformationsänderungen der Proteine führen kann. Letzteres kann die Ursache dafür sein, daß obgleich bei den Antigenen EX-1 und EX-4 Hinweise auf eine Proteinstruktur vorlagen, diese letztlich nicht präzipitiert werden konnten.

6. Anwendungen des Antikörpers EX-1 in entwicklungsbiologischen Fragestellungen

Von den hergestellten monoklonalen Antikörpern wurde der Antikörper EX-1 in seiner Zellspezifität am Umfangreichsten untersucht. Charakteristisch ist seine neuronale Zellspezifität, gezeigt an in vitro als auch in vivo differenzierten neuronalen Zellen. Darüber hinaus wird das Antigen im 1009-Zellmodell noch von einem zweiten neuronalen Zelltyp, einer Subpopulation astrozytenartiger Zellen, exprimiert. Immer wenn wie bei EX-1 ein Antigen von zwei verschiedenen neuronalen Zelltypen exprimiert wird, stellt sich in der neuronalen Entwicklungsbiologie die Frage, ob dies auf einen gemeinsamen Stammbaum der neuronalen Zelltypen hinweist. Bislang erwies es sich jedoch als schwierig neurale Vorläuferzellen zu charakterisieren. Während reife Zelltypen anhand der Expression spezifischer Markermoleküle immunologisch gut charakterisiert worden sind, sind mit A2B5 und NG2 bislang nur zwei Moleküle charakterisiert, die auch von bipotentiellen, glialen Vorläuferzellen, hier in Kulturen vom postnatalen optischen Nerv der Ratte bzw. bei A2B5 zusätzlich in embryonalen Gehirnprimärkulturen der Ratte, exprimiert werden (16-18,145). Im folgenden werden Untersuchungen zu Stammbaumanalysen und Vorläuferstudien am 1009-Zelldifferenzierungsmodell mit dem Antikörper EX-1 vorgestellt.

6.1 Neurale Vorläuferstudien mittels Komplement-abhängiger Zellyse

Astrozytenartige, da GFAP-positive Zellen, sind im 1009-Zellmodell erst am Differenzierungstag 5-6 mit dem Auswachsen einer Schicht von Zellen mit flacher Morphologie nachweisbar. Für die Koexpression von EX-1 und GFAP sind nun zwei Erklärungen denkbar:

- Das EX-1 Antigen wird vergleichbar zur GFAP-Expression erst mit der Reifung der astrozytenartigen Zellen von einer Subpopulation dieser exprimiert.

- Astrozytenartige Zellen differenzieren aus EX-1-positiven Vorläuferzellen, wobei das EX-1-Antigen von einer Subpopula-

tion der astrozytenartigen Zellen exprimiert wird, oder das EX-1-Antigen wird nur von unreifen astrozytenartigen Zellen noch koexprimiert.

Um das Vorkommen von EX-1-positiven Vorläuferzellen zu testen, wurden die EX-1-positiven Zellen vom Zeitpunkt des neuronalen Netzwerks an lysiert. Die 1009-Zellen wurden zunächst mit einer EX-1-Antikörperlösung inkubiert. Lysiert wurde durch Zugabe von Kaninchenkomplement. Kontrollansätze wurden ohne Antikörper, d.h. ausschließlich mit Komplement inkubiert, wobei Medienwechsel und Waschprozesse denen der Testansätze entsprachen. Die Versuchsauswertung erfolgte in der indirekten Einfach- und Doppelimmunfluoreszenz anhand der Markerexpression von EX-1 und GFAP. Ein möglichst quantitatives Entfernen der EX-1-positiven Zellen wurde durch tägliche Lyse von D2 bis D7, bei einigen Ansätzen zusätzlich an D9, erzielt. In Abb. 26 ist eine deutliche Abnahme der neuronartigen Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz zu beobachten. Selbst an späten Differenzierungszeitpunkten sind keine einzelnen neuronartigen Zellen (siehe Abb.5: I) zu beobachten. Ein Fehlen der astrozytenartigen Zellen, wie dies bei Lyse ihrer Vorläuferzellen der Fall wäre, ist nicht zu beobachten. Auch nach Lyse reifen astrozytenartige Zellen (Abb.27), von denen eine Subpopulation das EX-1-Antigen koexprimiert. In Abb. 27 ist ebenfalls gezeigt, daß weitere EX-1-positive Zellen mit flacher Morphologie ausreifen. Aussagen zum quantitativen Anteil differenzierender astrozytenartiger Zellen sind nicht möglich, da an adhärenenten Kulturen nur eine grobe Abschätzung vorgenommen werden kann. Des weiteren sind Interaktionen zwischen Astrozyten und Neuronen beschrieben. So haben in Kleinhirnprimärkulturen die Neurone einen Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung der Astrozyten (147). Auch im 1009-Zellmodell wäre eine nach Lyse der neuronartigen Zellen modifizierte Proliferation der astrozytenartigen Zellen denkbar.

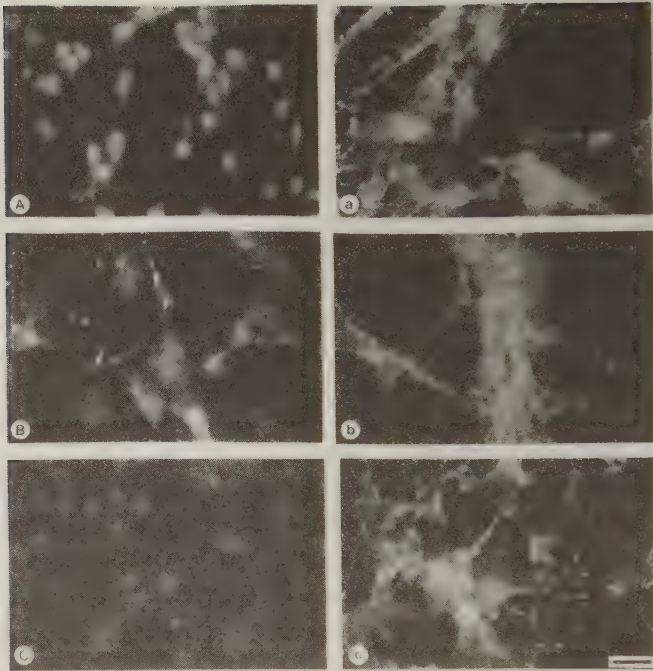


Abb. 26: Expression des EX-1-Antigens in differenzierten 1009-Zellen nach Komplement-abhängiger Zellyse mit Antikörper EX-1 (A,B,C) bzw. in Kontrollansätzen (a,b,c) ohne den Antikörper EX-1.

Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Kaninchenserum-anti-Ratte Ig an den Differenzierungstagen D3(A,a), D4(B,b) und D5(C,c). Die Komplement-abhängige Zellyse wurde an D2, D3 und D4 durchgeführt. Abgebildet sind nur die Fluoreszenzaufnahmen. Der Balken in c entspricht $20\mu\text{m}$.

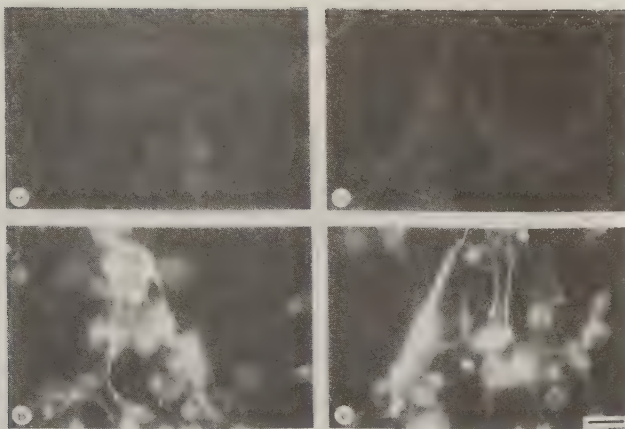


Abb. 27: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung D6-differenzierter 1009-Zellen mit dem Antikörper EX-1 (A,a) und dem Antikörper anti-GFAP (B,b).

Der Nachweis von EX-1 erfolgte mit TR-markiertem Avidin und der von Antikörper GFAP mit FITC-markierten Zweitantikörpern. Getestet wurde nach Komplement-abhängiger Zellyse mit Antikörper EX-1 (A,B) bzw. in Kontrollansätzen (a,b), in denen nur mit Komplement inkubiert wurde. Lysiert wurde täglich von D2-D5. Der Balken in b entspricht 20µm.

6.2 EX-1-exprimierende Vorläuferzellen nach Induktion mit RA

Eine Differenzierung der 1009-Zellen wurde in allen bisherigen Versuchen mit den chemischen Induktoren RA und dbcAMP induziert, wobei zunächst einen Tag mit RA vorinkubiert wurde. Wird auf eine Zugabe von dbcAMP verzichtet und ausschließlich mit RA induziert, ist in der indirekten Immunfluoreszenz mit Antikörper EX-1 anhand der Morphologie positiver Zellen kein qualitativer Unterschied zum Differenzierungsmuster mit beiden Induktoren festzustellen (Abb.28 bzw. Abb.5 nach Induktion mit RA und dbcAMP). Zu frühem Zeitpunkt ist ein fluoreszierendes Netzwerk positiver Zellen und zu spätem Zeitpunkt sind fluoreszierende Zellen mit kleinem Zellkörper und langen Ausläufern, sowie solche mit flacher Morphologie nachzuweisen (Abb.28). Immunfluoreszenzen mit den Antikörpern EX-3 und EX-4 führen zum gleichen Ergebnis. Vergleichende Studien mit dem neuronalen Marker L1 zeigen jedoch interessante Ergebnisse im Hinblick auf die Reifung neuronaler Zellen.

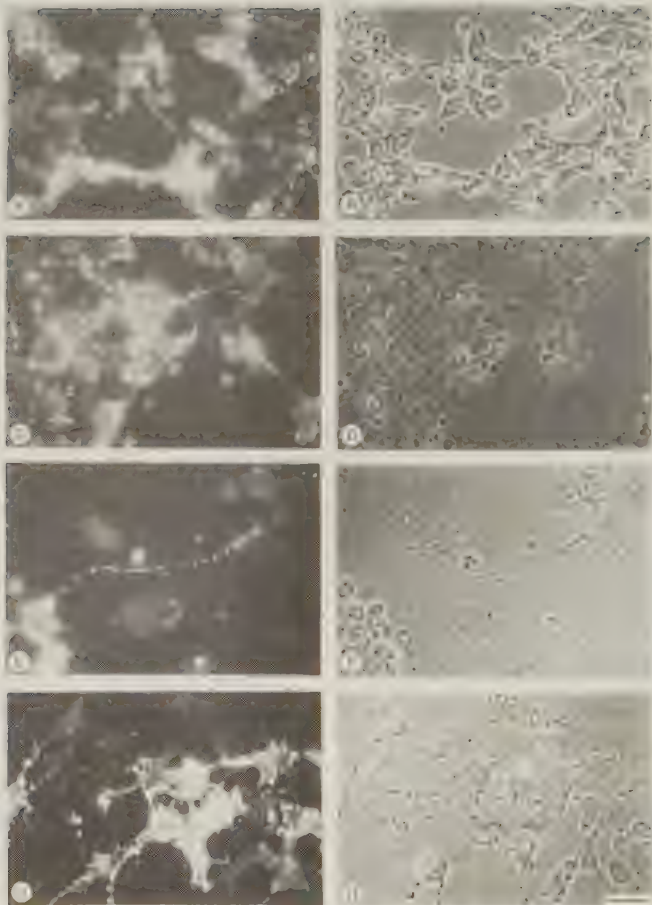


Abb. 23: Expression des Antigens EX-1 in 1009 Zellen nach Induktion mit RA. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC markierten Kaninchenserum-anti-Maus IgG (A-D) und 12 (E-H) Tage nach RA-Zugabe. Jeweils rechts sind die entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen abgebildet. Der Balken in F entspricht 20 μm .

EX-1-expressierende Zellen sind schon einen Tag nach Induktion mit RA nachzuweisen. Auch ohne Zugabe des Induktors dbcAMP nimmt der Anteil positiver Zellen zu. 3 und 4 Tage

nach RA-Zugabe exprimieren deutlich mehr Zellen, solche mit Ausläufern als auch solche mit etwas abgeflachter Morphologie, das EX-1-Antigen (Abb.29: a,b). Demgegenüber ist die Zahl differenzierter, L1-postiver Neuronen nicht nur nach 1-2-tägiger Induktion, sondern auch nach 3-4-tägiger (Abb.29: A,B) Induktion mit RA deutlich geringer als nach Induktion mit RA und dbcAMP. Doppelimmunfluoreszenzstudien mit den Antikörpern EX-1 und L1 4 Tage nach RA-Zugabe verdeutlichen diese Diskrepanz in der Expression der korrespondierenden Antigene (Abb.30). Im üblichen Differenzierungsansatz (mit RA und dbcAMP als Induktoren) ist hingegen an D2 und D3 ein vergleichbar hoher Anteil an L1- und EX-1-exprimierenden Zellen zu beobachten (Abb.29: C,D,c,d). Siehe im Vergleich hierzu auch Abb. 7 (D3) mit guter Übereinstimmung in der Fluoreszenzfärbung nach Doppelmarkierung mit den Antikörpern EX-1 und anti-L1.

RA induziert einen hohen Anteil der 1009-EC-Zellen zur Expression des EX-1-Antigens. Eine Enddifferenzierung in neuronartige, L1-positive Zellen ist jedoch zum getesteten Zeitpunkt (4 Tage nach Induktion) nur bei wenigen dieser Zellen zu beobachten. Untersuchungen von Frau Dr. E. Lang zur Neurofilamentexpression zeigten ebenfalls, daß zu diesem Zeitpunkt weitaus weniger Neurofilament-positive Zellen nach Induktion mit RA differenzieren, als dies nach Induktion mit RA und dbcAMP der Fall ist. Mit EX-1 ist somit ein Zellmarker gegeben, der es ermöglicht im 1009-Zelldifferenzierungsmodell nach Induktion mit RA Vorläuferzellen von Neuronen zu markieren.

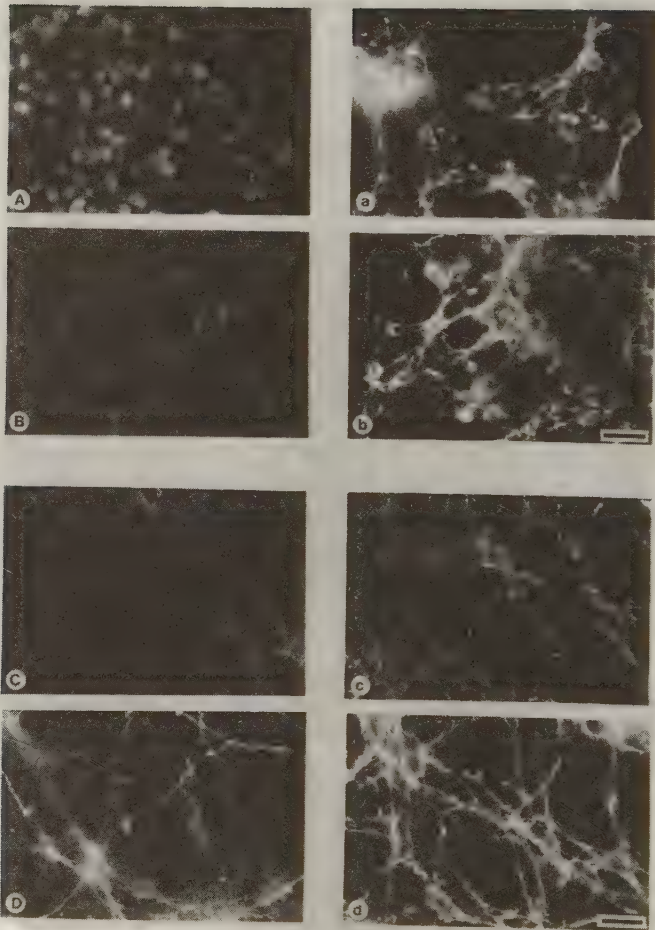


Abb. 29: Bindung der Antikörper EX-1(a,b,c,d) und L1(A,B,C,D) an differenzierte 1009-Zellen. Getestet wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit einem FITC-markierten Zweitantikörper. Induziert wurde mit RA (A,a: 3 Tage; B,b: 4 Tage) oder mit RA und dbcAMP (C,c: 3 Tage nach RA und 2 Tage nach dbcAMP; D,d: 4 Tage nach RA und 3 Tage nach dbcAMP). Abgebildet sind nur die Fluoreszenzaufnahmen. Der Balken in d entspricht 20 μm .

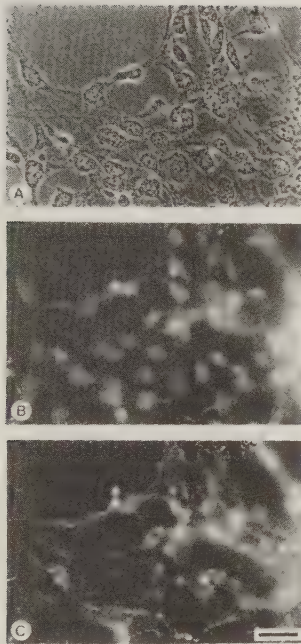


Abb. 30: Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit den Antikörpern EX-1 (C) und L1 (B) an 4 Tage mit RA induzierten 1009-Zellen. Der Nachweis der Antikörperbindung von EX-1 erfolgte mit Texasrot-markiertem Avidin und der von Antikörper EX-1 mit einem FITC-markierten Zweitantikörper. Der Balken in der Phasenkontrastaufnahme (A) entspricht 20 μm .

6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 6

In Kap. 6.1 und 6.2 sind Anwendungen des Antikörpers EX-1 zur Stammbaumanalyse und Vorläuferstudien im 1009-Zelldifferenzierungsmodell vorgestellt. Nach Komplement-abhängiger Zellyse mit Antikörper EX-1 zum Zeitpunkt des neuronalen Netzwerks reiften astrozytenartige Zellen und deren EX-1-exprimierende Subpopulation. EX-1-positive Vorläuferzellen für astrozytenartige Zellen konnten somit nicht nachgewiesen werden. Interessante Ergebnisse zeigten Untersuchungen zur Antigenexpression in Kulturen, die ausschließlich mit RA in-

duziert wurden. Das Antigen EX-1 wird schon sehr früh nach Zugabe des Induktors von vielen Zellen exprimiert, die jedoch im Gegensatz zu den mit RA und dbcAMP-differenzierten Zellkulturen noch nicht den Marker L1 für reife Neuronen exprimieren. Diese Zellen sind somit noch nicht enddifferenziert und stellen Vorläuferzellen dar.

IV. DISKUSSION

EC-Zelllinien zeigen in vieler Hinsicht Ähnlichkeiten zu frühen embryonalen Zellen und werden auf Grund ihres Differenzierungspotentials als in vitro Modelle für Differenzierungsstudien angewendet. Die EC-Zelllinie PCC7-S AzaR1 Klon 1009 (56) findet dabei als neurales Differenzierungsmodell Verwendung, da in vitro vorwiegend eine neurale Differenzierung gezeigt wurde (57,58,66).

Studien zu frühen Vorgängen der neuralen Differenzierung sind in vitro an neuralen Primärkulturen und in situ nur begrenzt durchführbar. Dies ist zum einen auf die hohe Zelltypdiversität, zum anderen auf den Mangel an genügend Zellmaterial sehr früher Entwicklungsstadien zurückzuführen. Es ist somit von großem Vorteil, wenn wie bei den EC-Zellen, auf nahezu unbegrenzte Mengen eines homogenen Ausgangsmaterials mit neuralem Differenzierungspotential zurückgegriffen werden kann. Um nun Fragen der frühen Neuralentwicklung am Zellmodell zu untersuchen, ist es erforderlich die Reproduzierbarkeit und das vollständige Differenzierungspotential des Zellmodells zu analysieren, wobei es sich anbot die Zelltypdiversität anhand der Expression spezifischer Markermoleküle mittels monoklonaler Antikörper zu charakterisieren. Die publizierten Daten zum Differenzierungsmuster der 1009-Zellen sind hingegen noch sehr unvollständig. In dieser Arbeit sollten daher monoklonale Antikörper erzeugt werden, um mit deren Hilfe Zellmarker zu definieren, die zur Charakterisierung des 1009-Zellmodells als auch bei entwicklungsbiologischen Fragestellungen Anwendung finden können.

Zur Erzeugung dieser Antikörper wurden 1009-Zellen nach chemischer Induktion mit RA und dbcAMP als Antigenmaterial verwendet, somit jenes Zellmaterial, welches mit Hilfe der Antikörper charakterisiert werden sollte. Um möglichst gegen alle Differenzierungsstadien Antikörper zu erzeugen, wurden 1009-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Induktion eingesetzt. Von Teratokarzinomzellen wurden bisher ausschließlich deren EC-Zellen zur Herstellung von Stammzellmarkern heran-

gezogen (38,39,43,148). Parallel zu meinem Projekt wurde in unserer Arbeitsgruppe außerdem eine Charakterisierung des 1009-Zellmodells mit Hilfe etablierter Antikörper u.a. anti-NF, anti-GFAP, anti-L1, anti-L2, anti-Thy1.2, anti-Mesa-I und A2B5 (19,104-106,112,122) vorgenommen, wobei diese aus Immunisierungen mit natürlichem Zellmaterial stammten. Im Gegensatz hierzu sollten möglichst viele der eigenen Antikörper gegen membranständige Antigene gerichtet sein, da Zelloberflächenmoleküle nicht nur wichtige Funktionen bei Zell-Zellinteraktionen der Differenzierung ausüben, sondern auch das Studium vitaler Zellen ermöglichen.

Es ist allgemein bekannt, daß frühes neurales Gewebe nur eine geringe Immunogenität besitzt. So sind bisher noch keine monoklonalen Antikörper beschrieben, die gegen ein mit dem 1009-Zellmaterial vergleichbar frühes neurales Gewebe erzeugt wurden. Die Anzahl der zu erwartenden monoklonalen Antikörper war auf Grund dieser Kenntnisse und der zu fordernden spezifischen Bindungseigenschaften gering. Umso wichtiger war daher durch Wahl eines geeigneten Testsystems, der indirekten Immunfluoreszenz, eine eindeutige Selektion der erzeugten Antikörper vorzunehmen. Die indirekte Immunfluoreszenz erwies sich als sehr vorteilhaft, da selbst jene Antikörper selektioniert werden konnten, die in anderen Testsystemen, RIA und ELISA, schwer nachweisbar sind.

Vorgestellt werden in dieser Arbeit sechs Antikörper EX-1 bis EX-6, die aus drei verschiedenen Immunisierungen resultierten; diese stellten die einzigen extrazellulär bindenden Antikörper dar. Alle Antikörper, auch jene aus der in vivo Immunisierung, sowie andere hier wegen unzureichender Stadienspezifität nicht vorgestellte Antikörper aus weiteren in vivo Immunisierungen, gehören der Ig-Klasse M an. Gleiche Ergebnisse zur Ig-Klasse wurden bei in vivo Immunisierungen mit EC-Zellen und embryonalem, neuralem Gewebe erzielt (19,43,148-150, persönliche Mitteilung von Frau S. Rheinhardt-Maelicke). Dies zeigt, daß frühes embryonales Gewebe, so auch neurales Gewebe, charakteristische, wenig immunogene Zelloberflächeneigenschaften besitzt, die womöglich nur eine

primäre Immunantwort induzieren. Die Ergebnisse zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Antikörper zeigten, daß hier mit den sechs Antikörpern ein für die Verwendung ausreichendes Repertoire an immunologischem Material hergestellt wurde.

Die Charakterisierung der Antikörper EX-1 bis EX-6 erfolgte wie deren Selektion in der indirekten Immunfluoreszenz am 1009-Zellmodell. Um einen Vergleich zur Expression der korrespondierenden Antigene bei nichttransformierten, natürlichen, reifen bzw. sich entwickelnden, neuronalen Zellen ziehen zu können, wurde stets auch eine in situ Expression im Gehirn und die Expression in postnatalen Kleinhirnkulturen der Maus hinzugezogen. Zugleich wurde die Gewebespezifität durch Bindung an etablierte Zelllinien verschiedenen Zelltyps getestet. Allgemein ist bei derlei Studien zur Antigenexpression zu beachten, daß praktisch niemals eine ausschließliche Zelltypspezifität zu beobachten ist. So kann das Epitop, wie dies für die Antikörper anti-L2 (114,151) und anti-SSEA-1 (60,129-131) gezeigt wurde, in gleicher oder ähnlicher Form verschiedenen Molekülen gemeinsam sein. So ist das L2-Karbohydratepitop des Antikörpers anti-L2 verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen gemeinsam (114,151).

Im 1009-Zellmodell differenziert nach chemischer Induktion zunächst bis D2/3 ein Netzwerk neuronaler Zellen. Ab D3 differenzieren Zellen mit flacher Morphologie, die bis D5/6 eine konfluente Zellschicht gebildet haben. Parallel hierzu bilden die neuronalen Zellen Aggregate und lösen sich schließlich bis D9 ab, so daß zu spätem Differenzierungszeitpunkt nur noch eine Zellschicht flacher Zellen mit wenigen überlebenden neuronartigen Zellen zu beobachten ist. Entsprechend der stadien- und zelltypspezifischen Expression ihrer korrespondierenden, membranständigen Antigene hebt sich der Antikörper EX-1 von den Antikörpern EX-2 bis EX-6 heraus. Ein Maximum an Antigen-exprimierenden Zellen ist schon früh nach chemischer Induktion zu beobachten, während der Anteil im weiteren Differenzierungsverlauf wieder abnimmt (Abb.5 und 6). Der Antikörper EX-1 zeigte zu frühem

Differenzierungszeitpunkt (D2/3) die gleiche Zelltypspezifität wie die neuronalen Zellmarker L1 und NF 68kD und NF 160kD (61-63,103-105). Auch an späteren Differenzierungsstagen zeigten die durch diese Marker charakterisierten neuronalen Aggregate und die einzelnen neuronartigen Zellen stets eine Bindung des Antikörpers EX-1. EX-1 stellt somit einen gleichwertigen Marker zu diesen etablierten neuronalen Markern dar. Im Gegensatz zu dem ebenfalls an ein membranständiges Molekül bindenden Antikörper L1 zeigte Antikörper EX-1 ab D5 eine Bindung an wenige Zellen mit flacher Morphologie (Abb.8).

Innerhalb der Gruppe flacher Zellen sind mittels etablierter Marker drei verschiedene Zelltypen, fibroblastenartige (Thy1.2-positiv, 13,87), astrozytenartige (GFAP-positiv, 64,65,105,107,108) und endothelartige (Mesa-I-positiv, 122,123) Zellen zu unterscheiden, wobei die fibroblastenartigen deutlich gegenüber den astrozytenartigen und diese gegenüber den endothelartigen Zellen überwiegen (Lang E., Mazauric-Stücker M.-L. & Maelicke A., Manuskript in Vorbereitung). Die differenzierenden endothel- und fibroblastenartigen flachen Zellen exprimierten das EX-1-Antigen nicht. Die in den Ergebnissen beschriebene Koexpression von EX-1 mit Thy1.2, als Marker für fibroblastenartige Zellen, ist auf Grund der Seltenheit dieser Zellen zur Gesamtzahl Thy1.2-exprimierender Zellen nicht signifikant. Für Thy1.2 wurde eine Expression von Fibroblasten beschrieben, daneben wurde aber auch eine Expression von Neuronen und Astrozyten beobachtet (13,87,118-121). Auch im 1009-Zellmodell konnte in seltenen Fällen eine Koexpression von neuronartigen Zellen beobachtet werden (persönliche Mitteilung von Frau Dr. E. Lang). Ursache für die im 1009-Zellmodell beobachtete Koexpression mit EX-1 kann auch eine unzureichende Zelltypspezifität des Thy1.2-Markers sein. In Doppelimmunfluoreszenzstudien mit GFAP wurde hingegen eine Koexpression des EX-1-Antigens von einer Subpopulation astrozytenartiger Zellen beobachtet (Abb.9). Antikörper EX-1 hat somit Gemeinsamkeiten mit den monoklonalen, neuronalen Antikörpern A2B5, anti-L2, anti-NG2 und anti-M2, deren membranständige Antigene von verschied-

denen neuronalen Zelltypen exprimiert werden (19,20,104,114,152,153). Auch die im 1009-Zellmodell getesteten Antikörper A2B5 und anti-L2 binden dominant an neuronenartige, daneben aber wie Antikörper EX-1 zu spätem Differenzierungszeitpunkt auch an wenige Zellen mit flacher Morphologie. Im Falle von A2B5 wurde eine Subpopulation der exprimierenden Zellen als astrozytenartige Zellen charakterisiert. Festzuhalten ist somit für Antikörper EX-1 eine neurale, dominant neuronale Zellspezifität im 1009-Zellmodell. Diese konnte in Studien an neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien gesichert werden, da sich die Expression des korrespondierenden Antigens fast ausschließlich auf die Neuroblastom-Hybridzelllinien beschränkt (Tab.VI). Eine neuronale Zelltypspezifität läßt sich auch anhand der Ergebnisse mit Kleinhirnprimärkulturen der Maus vermuten. Antikörper EX-1 zeigte eine Bindung an L1-positive Neuronen, während Gliazellen, Astrozyten und Oligodendrozyten (O4-positiv, 112) den Antikörper nicht banden (Abb.11). Ursache für die Diskrepanz in der Koexpression mit GFAP zum 1009-Zellmodell ist vermutlich das Vorkommen verschiedener Astrozytensubpopulationen in den beiden verwendeten Zellsystemen, was Ergebnisse mit Antikörper EX-3 bestätigen. In situ war eine EX-1-Expression im untersuchten neuronalen Gewebe, embryonalen Gehirn, sowie im postnatalen und adulten Kleinhirn zu beobachten. Die Fluoreszenz in postmitotischen Schichten zeigte, daß eine Antigenexpression erst mit Reifung der neuronalen Zellen erfolgt. Auch dies stimmt mit den Ergebnissen im 1009-Zellmodell überein. Im Gegensatz zur Kleinhirnprimärkultur zeigte sich jedoch eine deutliche Diskrepanz zur L1-Expression. Obgleich auch Antikörper L1 postmitotische Bereiche anfärbt, ist in der mitotischen externen Körnerschicht des Kleinhirns ein Gradient zunehmender Antigenexpression in den inneren Zellagen zur Molekularschicht zu beobachten (103,104). Zudem zeigte L1 eine wesentlich intensivere Fluoreszenz, mit besonderer Intensität in der Molekularschicht des postnatalen und adulten Gehirns (103,104). Bei Antikörper EX-1 war indessen nur eine schwache Fluoreszenz in den postmitotischen Schichten und eine stärkere Fluoreszenz der Körnerschicht gegenüber der Molekularschicht

im adulten Kleinhirn zu beobachten. Daneben wurde Antikörperbindung in Meningen und an Gefäße beobachtet.

Die monoklonalen Antikörper EX-2 bis EX-6 binden im 1009-Zellmodell dominant an die Zellgruppe mit flacher Morphologie und erreichen somit erst zu späterem Differenzierungszeitpunkt als EX-1 ein Maximum an Antigen-exprimierenden, differenzierten 1009-Zellen. Die Immunfluoreszenzstudien weisen bei den Antikörpern EX-2 und EX-5 auf eine nichtneuronale Zellspezifität hin, was sich u.a. auch in der komplementären Antigenexpression zu EX-1 zeigte. Neben einer Bindung an flache differenzierte 1009-Zellen (an D9 über 50% für EX-2 und bis 20% für EX-5, Abb.12 und 15) war für beide Antikörper eine Bindung an 1009-Stammzellen zu beobachten. Eine besondere Gewebespezifität liegt wohl nicht vor, da die Antikörper daneben auch eine Bindung an entodermale Zelllinien und Zelllinien ektodermalen (epitheliale Zellen) wie mesodermalen (Fibroblasten) Ursprungs zeigten (Tab.IX). Für Antikörper EX-6 ist ebenfalls keine Gewebespezifität aus den Immunfluoreszenzdaten am 1009-Zellmodell (maximal 10% positive Zellen an D9, Abb.16) und etablierten Zelllinien ersichtlich. In gleicher Weise wie bei den Antikörpern EX-2 und EX-5 ist auf Grund fehlender Antigenexpression von neuronartigen 1009-Zellen und Neuroblastom-Hybridzelllinien auch bei Antikörper EX-6 von einer nichtneuronalen Zellspezifität auszugehen. Eine Bindung an EC-Zellen wurde jedoch nicht beobachtet. In diesem Zusammenhang ist zu vermerken, daß EX-6 nicht nur an ein membranständiges Antigen, sondern weitaus umfangreicher an intrazelluläre Cytoskelettstrukturen bindet. Die intrazelluläre Bindung von Antikörper EX-6 ist vergleichbar zu derjenigen anderer monoklonaler Antikörper (A2B5, anti-O1, anti-O2, anti-O3, anti-N1, 20,112,128). An gereinigtem GFAP und Vimentin (59,60) wurde in Immunoblotstudien eine Bindung des Antikörpers EX-6 an diese Intermediärfilamentproteine gezeigt (Abb.23). Die Expression des intrazellulären Antigens in den getesteten Zelllinien und in situ im Gehirn steht dabei in guter Übereinstimmung mit der Expression von GFAP und Vimentin. So exprimieren die Zelllinien 3T3, HELF I30, PFHR9 und PYS-2 Vi-

mentin (persönliche Mitteilung von Frau Dr. E. Lang) und zeigten ebenfalls fluoreszierende, intrazelluläre Strukturen mit dem Antikörper EX-6, während MH_1C_1 -Zellen, ohne Vimentinexpression (154), das intrazelluläre EX-6-Antigen nicht exprimierten.

Bei den Antikörpern EX-3 und EX-4 lassen die Immunfluoreszenzdaten an etablierten Zelllinien im Gegensatz zu den Antikörpern EX-2, EX-5 und EX-6 eine enge Gewebespezifität erkennen (Tab.IX). Während Antikörper EX-3 am Differenzierungstag 9 zu einem hohen Anteil (50-70%) an Zellen mit flacher Morphologie bindet (Abb.13), wurde bei Immunfluoreszenzstudien in situ und in vitro nur noch in vitro eine Bindung an wenige Kleinhirnzellen beobachtet. Doppelimmunfluoreszenzstudien mit den Zellmarkern L1, Thyl.2, GFAP und Mesa-I zeigten nur eine Bindung an eine Subpopulation fibroblastenartiger 1009-Zellen und an Subpopulationen der GFAP- und Thyl.2-positiven Kleinhirnzellen (Tab.X). Aus Studien an postnatalen Kleinhirnkulturen der Maus ist bekannt, daß bei einer Subpopulation GFAP-exprimierender Astrozyten schon nach wenigen Tagen eine Koexpression von Thyl.2 zu beobachten ist (87). Hieraus kann geschlossen werden, daß auch EX-3 eine Subpopulation der Astrozyten in den Kleinhirnkulturen charakterisiert. Dies wird abgesichert durch eine fehlende Koexpression von EX-3 und Fibronectin als weiterer Marker für Fibroblasten (13,155). In diesen Doppelimmunfluoreszenzversuchen lag keine völlige Übereinstimmung der Zellspezifitäten vor. Dies ist nicht unerwartet, da mit der Kleinhirnkultur nur ein einziges neurales Gewebe, und dieses auch nur zu einem definierten Entwicklungszeitpunkt ausgewählt wurde, welches dem 1009-Zellmodell nicht entsprechen muß. Die beobachtete Diskrepanz zur Koexpression von EX-3 mit GFAP ist genau komplementär zu der von EX-1 und GFAP und sichert, daß in beiden Zellsystemen verschiedene Subpopulationen von Astrozyten, d.h. auch solche verschiedener Differenzierungszustände, vorhanden sind. Auch andere etablierte Antikörper, u.a. gegen ein gliales Zelloberflächenmolekül gerichtet (anti-Thyl.2, A2B5, anti-M2, anti-S1), ließen wie Antikörper EX-1 und EX-3 in neuro-

len Kulturen nur eine Bindung an eine Subpopulation der GFAP-positiven Astrozyten erkennen, wobei das Vorkommen dieser abhängig vom verwendeten neuralen Gewebe und der Kultivierungsdauer war (15,16-18,20,87,153,156).

Antikörper EX-4 bindet in vitro abgesehen von wenigen entodermalen Zellen ausschließlich an induzierte 1009-Zellen und Kleinhirnzellen. Von Letzteren wurden einige als Endothelzellsubpopulation (Mesa-I-positiv), ebenfalls gesichert durch eine in situ Bindung an Gefäße, charakterisiert, während keine eindeutige Zelltypspezifität in 1009-Kulturen zu erkennen war.

Die Daten zur Antigenexpression der Antikörper EX-1 bis EX-6 weisen auf einen stabilen Differenzierungsverlauf und somit auf ein reproduzierbares Differenzierungspotential der 1009-Zellen hin. Entsprechend der stadien- und zelltypspezifischen Antigenexpressionen sind daher im 1009-Zellmodell zumindest die folgenden drei verschiedenen Differenzierungsstadien zu unterscheiden: 1. neuronales Netzwerk an D2/3 (dominante Expression von EX-1), 2. neuronale EX-1-positive Zellen auf Schicht flacher Zellen mit dominanter Expression von EX-2 bis EX-6 an D5/6, sowie 3. Zellschicht flacher Zellen mit Expression von EX-2 bis EX-6 mit nur wenigen EX-1-positiven Zellen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits publizierten Daten zur Differenzierung von 1009-Zellen (57,58,66). So haben auch Pfeiffer et al. neben neuronalen Zellen solche mit flacher Morphologie beobachtet, die sich histochemisch im Gegensatz zu den neuronalen Zellen durch eine fehlende Acetylcholinesteraseaktivität auszeichnen (57). In diesen Arbeiten konnte der entsprechende Zelltyp jedoch nicht durch spezifische Zellmarker charakterisiert werden. Paulin et al. konnten mittels Antikörper gegen die Intermediärfilamente Vimentin, Neurofilamente, Präkeratin, Desmin und GFAP drei Zelltypen neuronenartige, astrozytenartige Zellen und einen Vimentin-positiven Zelltyp charakterisieren. Vimentin ist jedoch als spezifischer Marker ungeeignet, da das Protein in vitro von Zellen verschiedenen Zelltyps (60,157,158) und von EC-Zellen (55,58) exprimiert

wird. Im Gegensatz zu diesen publizierten Daten stehen mit den Antikörpern EX-1 bis EX-6 nunmehr Marker zur Verfügung, welche eine weitaus umfangreichere Charakterisierung mittels membranständiger Antigene ermöglichen.

Die Studien zur immunologischen Charakterisierung mit den Antikörpern EX-1 bis EX-6 stehen in guter Übereinstimmung mit der in unserem Labor vorgenommenen immunologischen Charakterisierung der Zelltypen mittels etablierter extra- und intrazellulärer Zellmarker. Diese zeigten ebenfalls drei Differenzierungsstadien und eine Charakterisierung von vier Zelltypen. Die Charakterisierung von Subpopulationen dieser Zelltypen mit den Antikörpern EX-1, EX-3 und EX-4 und die Immunfluoreszenzdaten mit den weniger spezifischen Antikörpern EX-2, EX-5 und EX-6 lassen jedoch eine höhere Zellheterogenität als die grobe Einteilung in vier Zelltypen erkennen. Damit stellen die eigenen Antikörper mehr als einen Ersatz für etablierte Zellmarker dar, sie ermöglichen auch eine bessere Aufschlüsselung (Diskriminierung) der vorhandenen Zellsubpopulationen. Änderungen in der zeitlichen Folge der Differenzierung als auch im Differenzierungspotential, ausgelöst durch veränderte Induktionsbedingungen als auch durch veränderte innere Eigenschaften der EC-Zellen, sollten nunmehr der experimentellen Analyse zugänglich sein.

Der Antikörper EX-1 verdeutlicht eine stadienabhängige, dominant neurale Differenzierung des 1009-Zellmodells und dessen berechnete Verwendung als neurales Zelldifferenzierungsmodell. Diese ist bei anderen EC-Zelllinien wie u.a. der EC-Zelllinie F9 nicht gegeben. F9-Zellen differenzieren in vitro vorwiegend in extraembryonales Entoderm (48-50), wenngleich von einigen Arbeitsgruppen unter bestimmten Differenzierungsbedingungen auch Populationen neuronaler Zellen nachgewiesen wurden (51,52,159). Der Klon 1009 besitzt gegenüber anderen ebenfalls vorwiegend neural differenzierenden Zelllinien wie C17-S1 Klon 1003 und P19 den Vorteil eines definierten Induktionssignals. So wurde bei der Zelllinie C17 eine neurale Differenzierung in serumfreiem Medium (47) und bei der Zelllinie P19 nach Aggregation und RA-Induktion (55)

beobachtet. Wenngleich das erhoffte ausschließlich neurale Differenzierungspotential nicht zu halten ist, ermöglicht das definierte Induktionssignal und die frühe ausschließlich neuronale Differenzierung Studien zum molekularen Mechanismus der Induktion und Differenzierung.

Die eigenen gegen membranständige Moleküle gerichteten Antikörper EX-1 bis EX-6 ermöglichen im Gegensatz zu publizierten Arbeiten, wo ausschließlich intrazelluläre Marker verwendet wurden, eine Selektion vitaler Zellen definierter Zellpopulationen und somit Differenzierungsstudien an isolierten Zellpopulationen sowie Zellinteraktionsanalysen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Antikörper könnte bei der Analyse von Zell-Zellinteraktionen neuraler und nicht-neuraler Zelltypen im Verlauf der Differenzierung liegen.

Unsere Untersuchungen am 1009-Modell zeigen, daß neben reifen, neuralen Zelltypen auch nichtneurale Zelltypen entstehen, wie sie auch im Gehirn nachzuweisen sind. Dies bietet die Möglichkeit, im 1009-Zellmodell Stammbaumbeziehungen insbesondere der neuralen Zelltypen Neurone und Astrozyten aufzuzeigen. Dabei soll ein Vergleich zur neuralen in vivo Differenzierung gezogen werden, wo die neuralen Zelltypen (Neurone und Gliazellen) aus den Neuroektodermzellen differenzieren (9). Unbekannt ist, ob die verschiedenen neuralen Zelltypen aus gemeinsamen Vorläuferzellen differenzieren, oder ob schon früh in der Neurogenese eine Trennung der Entwicklungswege erfolgt. Ein Ansatz zur Untersuchung ist die immunologische Charakterisierung von Antigenen, die von gemeinsamen Vorläuferzellen verschiedener neuraler Zelltypen charakterisiert werden. Interessant verbleibt im 1009-Zellmodell die Selektion EX-3-positiver 1009-Zellen, da bisher außer in diesem Modell nur eine Expression des Antigens bei einer Subpopulation von Astrozyten in Kleinhirnkulturen beobachtet wurde. So könnte EX-3 im 1009-Zellmodell gliale Vorläuferzellen charakterisieren, obgleich eine Koexpression mit dem Marker Thy1.2 gezeigt wurde. Hinweise für EX-1-positive Vorläuferzellen in 1009-Kulturen für astrozytenartige Zellen bzw. deren EX-1-exprimierende Subpopulation konnten

mittels negativer Selektion, Komplement-abhängiger Zellyse früh differenzierender EX-1-positiver Zellen, noch nicht gezeigt werden.

In anderen Versuchen ließ sich jedoch zeigen, daß EX-1 einer jenen seltenen Antikörper darstellt, die noch nicht voll ausgereifte Zellen charakterisieren. Während eine Induktion mit RA und dbcAMP zur Entwicklung EX-1-positiver reifer, neuronaler Zellen führt (Koexpression neuronaler Zellmarker), sind nach Induktion mit RA zum getesteten frühen Zeitpunkt (1-4 Tage nach RA-Zugabe) die überwiegende Zahl der EX-1-positiven Zellen negativ für L1, einen Zellmarker für reife postmitotische Neuronen (Abb.29,30). Für die Zukunft ergibt sich daher die Möglichkeit, nach Selektion dieser positiven Vorläuferzellen, durch Techniken wie "Panning" bzw. im Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS), deren Differenzierungspotential unter einer Vielzahl verschiedener Induktionsbedingungen zu testen. Da EX-1 von neuronartigen und astrozytenartigen 1009-Zellen exprimiert wird, besteht Hoffnung, daß hier möglicherweise erstmals in vitro gemeinsame Vorläuferzellen für neuronale und gliale Zellen gezeigt werden können. Für immunologische in vitro Studien zur neuronalen Stammbaumanalyse in neuronalen Primärkulturen standen bisher erst zwei Zellmarker, A2B5 und NG2, zur Verfügung (16-18,145). Beide markieren in Primärkulturen des postnatalen optischen Nerven und bei A2B5 zusätzlich in Primärkulturen des embryonalen Kleinhirns bipotentielle gliale Vorläuferzellen. Diese differenzieren in Abhängigkeit der Medienzusammensetzung in TypII-Astrozyten (Anwesenheit von Serum) oder in Oligodendrozyten (serumfrei). Gemeinsame Vorläuferzellen für neurale und gliale Zellen, wie dies für EX-1 erhofft wird, wurden dagegen erstmals kürzlich mittels retroviraler Markierung in situ in der postnatalen Retina der Ratte gezeigt (23).

Die Existenz EX-1-exprimierender Vorläuferzellen nach RA-Induktion zeigt, daß die neuronale Reifung ein mehrstufiger Prozeß ist, der somit die Beteiligung von mehreren Faktoren voraussetzt. Die für EX-1 beobachtete Expression nach RA-In-

duktion eröffnet die Möglichkeit, molekulare Mechanismen der RA-Induktion am 1009-Zellmodell zu untersuchen. Dies ist insofern interessant, als mit RA das erste Morphogen der in vivo Differenzierung bei Vertebraten charakterisiert wurde (69). Schon früher wurden für RA intrazelluläre Bindungsproteine (CRABP) beschrieben (160-164), deren Funktion vermutlich darin besteht, RA in den Zellkern zu transportieren. Dort kann RA an Chromatin binden, wie Experimente mit RA-CRABP-Komplexen an isolierten Zellkernen zeigten (165), oder könnte an einen kürzlich klonierten Kernrezeptor binden (70,71).

Unsere Erwartungen, die mit dieser erstmaligen Erzeugung monoklonaler Antikörper gegen sehr frühes neurales Gewebe verbunden waren, konnten somit mit der Herstellung der sechs Antikörper EX-1 bis EX-6 erfüllt werden. Wie erhofft, können die Antikörper nicht nur bei der Definierung des in vitro Zellmodells, sondern darüber hinaus in Studien zu entwicklungsbiologischen Fragestellungen verwendet werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Maus-EC-Zelllinie PCC7-S AzaR1 Klon 1009 kann durch Zugabe der Induktoren RA und dbcAMP zur neuronalen Differenzierung induziert werden. Eine umfassende Charakterisierung aller differenzierten Zelltypen, eine Voraussetzung für die Verwendung als neurales in vitro Zelldifferenzierungsmodell, lag bisher jedoch nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs monoklonale Antikörper, EX-1 bis EX-6, durch Immunisierung mit differenziertem 1009-Zellmaterial hergestellt. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz wurde die studienspezifische Expression ihrer membranständigen Antigene gezeigt und eine Stadieneinteilung der Differenzierung sowie immunologische Charakterisierung der differenzierten Zelltypen vorgenommen.

Antikörper EX-1 bindet an Zellen mit neuronaler Zellspezifität, wie anhand der charakteristischen Zellmorphologie und in Doppelimmunfluoreszenzstudien mit den etablierten neuronalen Antikörpern A2B5, anti-L1 und anti-Neurofilamente gezeigt werden konnte. Diese neuronale Zellspezifität konnte durch vergleichende Immunfluoreszenzstudien an etablierten Zelllinien verschiedenen Zelltyps und in Kleinhirn-primärkulturen der Maus, hier ebenfalls in Doppelimmunfluoreszenzstudien mit anti-L1, gesichert werden. Die neuronartigen Zellen stellen den ersten differenzierenden Zelltyp im 1009-Zellmodell dar, und die Bildung eines Netzwerks dieser Zellen markiert das erste Differenzierungsstadium.

Verzögert zu den neuronartigen Zellen differenzieren Zellen mit flacher Morphologie, die schließlich zu einer konfluenten Einzelzellschicht auswachsen. An diese zweite Zellgruppe binden dominant die Antikörper EX-2 bis EX-6. Eine Bindung an die EX-1-positiven neuronartigen Zellen wurde mit Ausnahme von Antikörper EX-4 nicht beobachtet. Der für jeden der Antikörper EX-2 bis EX-6 charakteristische Anteil positiver, flacher Zellen (zwischen 10% und über 90% am Differenzierungstag 9) und deren gewebespezifische Expression

in vitro auf verschiedenen Zelllinien und in situ im Mausgehirn zeigen eine deutliche Heterogenität innerhalb der Gruppe flacher 1009-Zellen.

Neben einem zweiten Differenzierungsstadium, EX-1-positive, neuronenartige Aggregate auf einer Schicht flacher Zellen, stellt nach dem Ablösen der neuronenartigen Zellen die konfluente Schicht flacher Zellen mit dominanter Expression der Antigene EX-2 bis EX-6 das dritte Stadium dar.

Doppelimmunfluoreszenzstudien mit anti-GFAP-Antikörpern als Marker für astrozytenartige Zellen zeigten, daß Antikörper EX-1 neben der dominant neuronalen Zellspezifität im 1009-Zellmodell auch an eine Subpopulation dieses zweiten neuronalen Zelltyps, der der Zellgruppe mit flacher Morphologie angehört, bindet.

Neben differenzierten Neuronen markiert der Antikörper EX-1 auch zu frühem Differenzierungszeitpunkt nach Induktion mit RA Vorläuferzellen, die den Marker L1 für reife neuronartige Zellen noch nicht exprimieren. Letztere Eigenschaften des Antikörpers EX-1 verdeutlichen seine Bedeutung für neurale Stammbaumanalysen und für Studien zum molekularen Mechanismus der Induktion und Differenzierung.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. Haymaker W. & Adams R.D.
"Histology and Histopathology of the Nervous System"
Charles C Thomas Publisher, Springfield, Vol. 1 (1982)
2. Stevens C.F.
Sci. Am. 241, 48-59 (1979)
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D.
"Molekularbiologie der Zelle" (Übersetzung: Jaenicke L.) VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Kap. 15 (1986)
4. Gurdon J.B.
"The Control of Gene Expression in Animal Development"
Harvard University Press, Cambridge (1974)
5. Spemann H.
"Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung" Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1936)
6. Jacobson M.
"Developmental Neurobiology" Plenum Press, New York & London, Kap. 1 (1978)
7. Le Douarin N.M.
Nature 286, 663-669 (1980)
8. Weston J.A.
Adv. Morphog. 8, 41-114 (1970)
9. Jacobson M.
"Developmental Neurobiology" Plenum Press New York & London, Kap. 2 (1978)
10. Jacobson M.
"Developmental Neurobiology" Plenum Press New York & London, Kap. 3 (1978)
11. Miale I.L. & Sidman R.L.
Exp. Neurol. 4, 277-296 (1961)
12. Schachner M.
J. Neurosci. 39, 1-8 (1982)
13. Raff M.C., Fields K.L., Hakomori S.-I., Mirsky R., Pruss R.M. & Winter J.
Brain Res. 174, 283-308 (1979)
14. Mirsky R.; Schachner M.
in: "Neuroimmunology" (Brockes J., ed.) Plenum Press, New York & London, Kap. 6 und Kap. 8 (1982)
15. Raff M.C., Abney E.R., Cohen J., Lindsay R. & Noble M.
J. Neurosci. 3, 1289-1300 (1983)

16. Raff M.C., Abney E.R. & Miller R.H.
Dev. Biol. 106, 53-60 (1984)
17. Raff M.C., Miller R.H. & Noble M.
Nature 303, 390-396 (1983)
18. Williams B.P., Abney E.R. & Raff M.C.
Dev. Biol. 112, 126-134 (1985)
19. Eisenbarth G.S., Walsh F.S. & Nirenberg M.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4913-4917 (1979)
20. Schnitzer J. & Schachner M.
Cell Tissue Res. 224, 625-636 (1982)
21. Price J., Turner D. & Cepko C.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 156-160 (1987)
22. Sanas J.R., Rubenstein J.L.R. & Nicolas J.
EMBO J. 5, 3133-3142 (1986)
23. Turner D.L. & Cepko C.L.
Nature 328, 131-136 (1987)
24. Stevens L.C. & Little C.C.
Proc. Natl. Acad. Sci. 40, 1080-1087 (1954)
25. Stevens L.C.
Adv. Morphog. 6, 1-31 (1967)
26. Pierce G.B.
Current Topics Dev. Biol. 2, 223-246 (1967)
27. Martin G.R.
Science 209, 768-776 (1980)
28. Illmensee K. & Stevens L.C.
Sci. Am. 240, 86-98 (1979)
29. Stevens L.C.
J. Natl. Cancer Inst. 38, 549-552 (1967)
30. Stevens L.C. & Varnum D.S.
Dev. Biol. 37, 369-380 (1974)
31. Stevens L.C.
Dev. Biol. 21, 364-382 (1970)
32. Stevens L.C.
J. Natl. Cancer Inst. 44, 929-932 (1970)
33. Nicolas J.F., Avner P., Gaillard J., Guenet J.L.,
Jakob H. & Jacob F.
Cancer Res. 36, 4224-4231 (1976)
34. Bernstine E.G., Hooper M.L., Grandchamp S. & Ephrussi
B.
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 3899-3903 (1973)

35. Nicolas J.F., Jakob H. & Jacob F.
in: "Functionally Differentiated Cell lines" (Sato G., ed.) Alan R. Liss, Inc., New York, 185-210 (1981)
36. Martin G.R.
in: "Teratocarcinoma Stem Cells" (Silver L.M., Martin G.R. & Strickland S., eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, App. 690-717 (1983)
37. Gacheline G., Kemler R., Kelly F. & Jacob F.
Dev. Biol. 57, 199-209 (1977)
38. Jacob F.
Immunol. Rev. 32, 3-32 (1977)
39. Arzt K., Dubois P., Bennett D., Condamine H., Babinet C. & Jacob F.
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 2988-2992 (1973)
40. Solter D. & Knowles B.B.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5565-5569 (1978)
41. Stern P.L., Willison K.R., Lennox E., Galfre G., Milstein C., Secher D. & Ziegler A.
Cell 14, 775-783 (1978)
42. Bolter K. & Kemler R.
in: "Teratocarcinoma Stem Cells" (Silver L.M., Martin G.R. & Strickland S., eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 39-49 (1981)
43. Kemler R., Morello D. & Jacob F.
in: "Cell Lineage, Stem Cells & Cell Determination" (Le Douarin N.M., ed.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York & Oxford, 101-113 (1979)
44. Nicolas J.-F., Dubois P., Jakob H., Gaillard J. & Jacob F.
Ann. Microbiol. Institut Pasteur (Paris) 126, 3-22 (1975)
45. Martin G.R., Witey L.M. & Damjanov I.
Dev. Biol. 61, 230-244 (1977)
46. Rizzino A.
Dev. Biol. 95, 126-136 (1983)
47. Darmon M., Bottenstein J. & Sato G.
Dev. Biol. 85, 463-473 (1981)
48. Hogan B.L.M., Taylor A. & Adamson E.
Nature 291, 235-237 (1981)
49. Strickland S. & Mahdavi V.
Cell 15, 393-403 (1978)
50. Strickland S., Smith K.K. & Marotti K.R.
Cell 21, 347-355 (1980)

51. Wartiovaara J., Liesi P. & Rechardt L.
Cell Differ. 15, 125-128 (1984)
52. Koopman P. & Cotton R.G.H.
Exp. Cell Res. 168, 567-571 (1987)
53. Jakob H., Dubois P., Eisen H. & Jacob F.
CR Acad. Sci. Paris 286, 109-111 (1978)
54. McBurney M.W., Jones-Villeneuve E.M.V., Edwards M.K.S.
& Anderson P. J.
Nature 299, 165-167 (1982)
55. Jones-Villeneuve E.M.V., McBurney M.W., Rogers K.A. &
Kalnins V.I.
J. Cell. Biol. 94, 253-262 (1982)
56. Fellous M., Günther E., Kemler R., Wiels J., Berger R.,
Guenet J.L., Jakob H. & Jacob F.
J Exp. Med. 148, 58-70 (1978)
57. Pfeiffer S.E., Jakob H., Mikoshiba K., Dubois P.,
Guenet J.L., Nicolas J.-F., Gaillard J., Chevance G. &
Jacob F.
J. Cell Biol. 88, 57-66 (1981)
58. Paulin D., Jakob H., Jacob F., Weber K. & Osborn M.
Differentiation 22, 90-99 (1982)
59. Lazarides E.
Nature 283, 249-256 (1980)
60. Traub P.
"Intermediate Filaments" Springer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York (1985)
61. Liem R.K.H., Yen S.-H., Salomon G.D. & Shelanski M.L.
J. Cell Biol. 79, 637-645 (1978)
62. Shaw. G. & Weber K.
Nature 298, 277-279 (1982)
63. Lee V.M.-Y., Wu H.L. & Schlaepfer W.W.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 6089-6092 (1982)
64. Bignami A., Eng L.F., Dahl D. & Uyeda T.
Brain Res. 43, 429-435 (1972)
65. Eng L.f., Vanderhaeghen J.J., Bignami A. & Gerstl B.
Brain Res. 28, 351-354 (1971)
66. Eddie B., Jakob H. & Darmon M.
EMBO J. 2, 1473-1478 (1983)
67. Moore E.E., Mitra N.S. & Moritz E.A.
Differentiation 31, 183-190 (1986)

68. Lotan R.
Biochim. Biophys. Acta 605, 33-91 (1980)
69. Thaller C. & Eichele G.
Nature 327, 625-627 (1987)
70. Giguere V., Ong E.S., Segui P. & Evans R.M.
Nature 330, 624-629 (1987)
71. Petkovich M., Brand N.J., Krust A. & Chambon P.
Nature 330, 444-450 (1987)
72. Minna J.D., Yarlow J. & Coon H.G.
Genetics (Suppl.) 79, 373-383 (1975)
73. Hamprecht B.
Int. Rev. Cytol. 49, 99-170 (1977)
74. Busis N.A., Daniels M.P., Bauer H.C., Pudimat P.A.,
Sonderegger P., Schaffner A.E. & Nirenberg M.
Brain Res. 324, 201-210 (1984)
75. Amano T., Richelson E. & Nirenberg M.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 258-263 (1972)
76. Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L. & Sweet W.
Science 161, 370-371 (1968)
77. Lehman J.M., Speers W.C., Swartzendruber D.E. & Pierce
G.B.
J. Cell. Physiol. 84, 13-28 (1974)
78. Kramer R.H. & Vogel K.G.
J. Natl. Cancer Inst. 72, 889-899 (1984)
79. Chung A.E., Ester L.E., Shinzuka H., Braginski J., Lorz
C. & Chung C.E.
Cancer Res. 37, 2072-2081 (1977)
80. Todaro G. & Green H.
J. Cell Biol. 17, 299-313 (1963)
81. Sanford K.K., Earle W.R. & Kikely J.
Natl. Cancer Inst. 9, 229 (1948)
82. Tashjian A.H., Yasumuru Y., Levine., Sato G.H. & Parker
M.L
Endocrinology 82, 342-352 (1968)
83. Richardson U.I., Tashjian A.H. & Levine L.
J. Cell Biol. 40, 236-247 (1969)
84. Breitkreuz D., Hornum J., Pöhlmann J., Brown-Bierman
L., Bohnert A., Bowder P.E. & Fusenig N.E.
Eur. J. Cell Biol. 42, 255-267 (1986)
85. Greene L.A. & Tischler A.S.
Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2424-2428 (1976)

86. Cheng T.R.
Exp. Cell Res. 104, 255-262 (1977)
87. Schnitzer J. & Schachner M.
J. Neuroimmunol. 1, 429-456 (1981)
88. Köhler G. & Milstein C.
Nature 256, 495-497 (1975)
89. Galfre G., Milstein C. & Wright B.
Nature 277, 131-133 (1979)
90. Littlefield J.W.
Exp. Cell Res. 41, 190-196 (1966)
91. Lang E.
Dissertation, Heidelberg (1986)
92. Ross B.D.
Brain Res. 291, 193-196 (1984)
93. Ouchterlony O.
Acta Path. Microbiol. Scand. 32, 231-240 (1953)
94. Peters J.H., Baumgarten H. & Schulze M.
"Monoklonale Antikörper" Springer, Berlin , Heidelberg,
New York, 209-212 (1985)
95. Costello S.M., Felix R.T. & Giese R.W.
Clin. Chem. 25, 1573-1580 (1979)
96. Huet C. & Herzberg M.
J. Ultrastruct. Res. 42, 186-199 (1973)
97. Marchalonis J.J., Cone R.E. & Santer V.
Biochem. J. 124, 921-927 (1971)
98. Laemmli U.K.
Nature 227, 680-685 (1970)
99. Towbin H., Staehelin T. & Gordon J.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354 (1979)
100. Kyse-Andersen J.
J. Biochem. Biophys. Meth. 10, 203-209 (1984)
101. Bradford M.M.
Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
102. Spector T.
Anal. Biochem. 86, 142-146 (1978)
103. Rathjen F. & Schachner M.
EMBO J. 3, 1-10 (1984)
104. Rathjen F.
Dissertation, Heidelberg (1982)

105. Debus E., Weber K. & Osborn M.
Differentiation 25, 193-203 (1983)
106. Shaw G., Debus E. & Weber K.
Eur. J. Cell Biol. 34, 130-136 (1984)
107. Bignami A. & Dahl D.
J. Comp. Neurol. 153, 27-38 (1974)
108. Bignami A., Dahl D. & Rueger D.C.
Adv. Neurobiol. 1, 285-310 (1980)
109. Raff M.C., Mirsky R., Fields K.L., Lisak R.P., Dorfmann S.H., Silberberg D.H., Gregson N.A., Leibowitz S. & Kennedy M.C.
Nature 274, 813-816 (1978)
110. Ranscht B., Clapshaw P.A., Price J., Noble M. & Siefert W.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2709-2713 (1982)
111. Norton W.T. & Autilio L.A.
J. Neurochem. 13, 213-222 (1966)
112. Sommer I. & Schachner M.
Dev. Biol. 83, 311-327 (1981)
113. Berg G.J. & Schachner M.
Cell Tissue Res. 224, 637-645 (1982)
114. Kruse J., Mailhammer R., Wernecke H., Faissner A., Sommer I., Goridis C. & Schachner M.
Nature 311, 153-155 (1984)
115. Barclay A.N., Letarte-Muirhead M. & Williams A.F.
Nature 263, 563-567 (1976)
116. Williams A.F., Barclay A.N., Letarte-Muirhead M. & Morris R.J.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 51-61 (1977)
117. Reif A.E. & Allen J.M.V.
J. Exp. Med. 120, 413-433 (1964)
118. Pruss R.M.
Nature 280, 688-690 (1979)
119. Currie D.N., Fields K.L. & Dutton G.R.
Proc. Int. Soc. Neurochem. 6, 635-637 (1977)
120. Schnitzer J. & Schachner M.
J. Neuroimmunol. 1, 471-487 (1981)
121. Abney E.R., Bartlett P.P. & Raff M.C.
Dev. Biol. 83, 301-310 (1981)

122. Ghandour S., Langley K., Gombos G., Hirn M., Hirsch M.R. & Goridis C.
J. Histochem. Cytochem. 30, 165-170 (1982)
123. Langley O.K., Ghandour M.S., Gombos G., Hirn M. & Goridis C
Neurochem. Res. 7, 349-362 (1982)
124. Brulet P., Babinet C., Kemler R. & Jacob F.
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 4113-4117 (1980)
125. Oshima R.G.
J. Biol. Chem. 257, 3414-3421 (1982)
126. Borrebaek C.A.K.
TIB TECH June, 147-153 (1986)
127. Amano T., Hamprecht B. & Kemper W.
Exp. Cell Res. 85, 399-408 (1974)
128. Schnitzer J., Kim S.U. & Schachner M.
Dev. Brain Res. 15, 21-32 (1984)
129. Fox N., Damjanov I., Martinez-Hernandez A., Knowles B.B. & Solter D.
Dev. Biol. 83, 391-398 (1981)
130. Gooi H.C., Feizi T., Kapadia A., Knowles B.B., Solter D. & Evans M.I.
Nature 292, 156-158 (1981)
131. Kannagi R., Nudelman E., Levery S.B. & Hakomori S.-I.
J. Biol. Chem. 257, 14865-14874 (1982)
132. Butler H. & Juurlink B.H.J.
"An Atlas for Staging Mammalian and Chick Embryos" CRC Press, Boca Raton (1987)
133. Rakic P.
Life Sci. Res. Rep. 20, 25-38 (1982)
134. Rakic P.
J. Comp. Neurol. 141, 283-312 (1971)
135. Rakic P. & Sidman R.L.
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 240-244 (1973)
136. Rakic P.
in: "Molecular Basis of Neural Development" (Edelman G.M., Gall W.E. & Cowan W.W., eds.) Wiley, New York, 139-159 (1985)
137. Franko M.C., Gibbs C.J., Rhoades D.A. & Gajdusek D.C.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 3482-3485 (1987)
138. Schnitzer J., Franke W.W. & Schachner M.
J. Cell Biol. 90, 435-447 (1981)

139. Houle J. & Fedoroff S.
Dev. Brain Res. 9, 189-195 (1983)
140. Cochard P. & Paulin D.
J. Neurosci. 4, 2080-2094 (1984)
141. Raju T., Bignami A. & Dahl D.
Dev. Biol. 85, 344-357 (1981)
142. Hirs C.H.W.
Methods Enzymol. 11, 216-222 und 230-231 (1962)
143. Cassidy J.T., Jourdian G.W. & Roseman S.
J. Biol. Chem. 240, 3501-3506 (1965)
144. Fredman P., Magnani J.L., Nirenberg M. & Ginsberg V.
Arch. Biochem. Biophys. 233, 661-666 (1984)
145. Stallcup W.B. & Beasley L.
J. Neurosci. 7, 2737-2744 (1987)
146. Rutishauser U.
Trends Neurosci. 9, 374-378 (1986)
147. Hatten M.E.
J. Cell Biol. 104, 1353-1360 (1987)
148. Nomoto S., Muramatsu H., Ozawa M., Suganuma T., Tashira M. & Muramatsu T.
Exp. Cell Res. 164, 49-62 (1986)
149. Draber P. & Pokórny Z.
Cell Differ. 15, 109-113 (1984)
150. Kindler-Röhrborn A., Ahrens O., Liepelt U. & Rajewsky M.F.
Differentiation 30, 53-60 (1985)
151. Kruse J., Keilhauer G., Faissner A., Timpl R. & Schachner M.
Nature 316, 146-148 (1986)
152. Stallcup W., Levine J. & Raschke W.
in: "Monoclonal Antibodies to Neural Antigens" (McKay R., Raff M.C. & Reichardt L.F., eds.) Cold Spring Harbor Reports in the Neurosciences, Cold Spring Harbor, New York, Vol. 2, 39-49 (1981)
153. Lagenaur C. Schachner M.
J. Supramol. Struct. Cell Biochem. 15, 335-346 (1981)
154. Franke W.W., Mager D., Schmid E., Denk H. & Borenfreund E.
Exp. Cell Res. 134, 345-365 (1981)
155. Schachner M., Schoonmaker G. & Hynes R.O.
Brain Res. 158, 149-158 (1978)

156. Schnitzer J., Kim S.U. & Schachner M.
Dev. Brain Res. 16, 203-217 (1984)
157. Franke W.W., Schmid E., Osborne M. & Weber K.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5034-5038 (1978)
158. Franke W.W., Schmid E., Winter S., Osborne M. &
Weber K.
Exp. Cell Res. 123, 25-46 (1979)
159. Liesi P., Rechardt L.R. & Wartiovaara J.
Nature 306, 265-267 (1983)
160. Chytil F.
Pharmacol. Rev. 36, 93S-100S (1984)
161. Grippo J.F. & Gudas L.J.
J. Biol. Chem. 262, 4492-4500 (1987)
162. Ong D.E., Crow J.A. & Chytil F.
J. Biol. Chem. 257, 13385-13389 (1982)
163. Matthaei K.I., McCue P.A. & Sherman M.I.
Cancer Res. 43, 2862-2867 (1983)
164. Erikson U., Hansson E., Nilsson M., Jönsson K.-H.,
Sundelin J. & Peterson P.A.
Cancer Res. 46, 717-722 (1986)
165. Takase S., Ong D.E. & Chytil F.
Arch. Biochem. Biophys. 247, 328-334 (1986)
166. Shubeita H.E., Sambrook J.F. & McCormick A.M.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 5645-5649 (1987)

Lebenslauf:

18.12.1958	geboren in Soest
1965-1968	Besuch der Thomä-Volksschule in Soest
1968-1977	Besuch des Conrad-von-Soest-Gymnasiums in Soest Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1977-1979	Besuch der Rheinischen Akademie e.V. Köln in Köln Abschluß: Biologisch-technische Assistentin
WS 1979/80	Immatrikulation an der Ruhr-Universität Bochum für den Studiengang Biologie (Diplom)
1981	Vordiplom
Dez. 1983	Diplomhauptprüfung
1984	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzen- physiologie bei Prof. N. Amrhein
März 1985	Abschluß: Diplom-Biologin
seit April 1985	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am MPI für Ernährungsphysiologie in Dortmund Promotion unter Anleitung von Prof. A. Maelicke

